

**Safi Amaro Monteiro**

**Caracterização Molecular e Estrutural de Biosurfactantes  
Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614**

**Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutor em Química,  
Programa de Pós-Graduação em Química,  
Setor de Ciências Exatas, Universidade  
Federal do Paraná.**

**ORIENTADORA: Prof. Dr<sup>a</sup>. NADIA KRIEGER**

**CURITIBA**

**2007**

**Safi Amaro Monteiro**

**Caracterização Molecular e Estrutural de Biosurfactantes  
Produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora formada pelos professores:

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nadia Krieger (Orientadora)**  
Departamento de Química  
UFPR

**Prof. Dr. Patrício G. P. Zamora**  
Departamento de Química  
UFPR

**Prof. Dr. Andersson Barison**  
Departamento de Química  
UFPR

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anita J. Marsaioli**  
Instituto de Química  
UNICAMP

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Gisella M. Zanin**  
Departamento de Engenharia Química  
UEM

Curitiba, 30 de maio de 2007.

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadia Krieger**  
**Co-orientadores: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos**  
**Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki**

## **AGRADECIMENTOS**

*Em primeiro lugar, a Deus e a Jesus Cristo por ter me dado Vida, Amor e Determinação em mais uma jornada tão diversificada que estou trilhando.*

Aos meus queridos pais, Ilda e Severino (in memoriam) pelo amor e pela força, fundamentais na minha formação.

À minha irmã Soraya, pelo apoio e atenção.

Ao meu querido esposo Mosart, pelo carinho, pelo amor, paciência e por me ajudar e me compreender nos momentos difíceis.

À minha querida orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Nadia Krieger, por sua orientação, confiança e estímulo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Guilherme Sasaki (Departamento de Química de Carboidratos da UFPR) e ao aluno Lauro que sem eles não apresentaria a caracterização estrutural neste trabalho.

Ao professor Dr. David Mitchell, do Departamento de Bioquímica da UFPR, que muito me ajudou na publicação do meu artigo.

À professora Dr<sup>a</sup> Janete M. de Araújo (Departamento de Antibióticos – UFPE) pela amizade e o fornecimento da cepa utilizada nesse trabalho.

Ao professor Dr. Luiz Pereira Ramos pela co-orientação e aos seus alunos pelos empréstimos de materiais e equipamentos.

Aos meus amigos de laboratório, Alessandra, Joel, Malu, Dayane, Domunit, Thaís, Edinéia, Daniele, Virgínia, Érika, Osvaldo e Marcelo, pelos momentos de descontração, pela amizade, paciência e força que muito me ajudaram.

À todos os meus colegas de trabalho da UTFPR-PG, especialmente a Coordenação de Alimentos.

A todos os colegas e funcionários da Pós-Graduação do Departamento de Química.

A todos meus professores, que contribuíram para minha formação.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO.....	18
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
2.1. BIOSURFACTANTES E MICRORGANISMOS PRODUTORES.....	20
2.2. ESTRUTURA DOS RAMNOLIPÍDEOS.....	24
2.3. PROPRIEDADES DOS RAMNOLIPÍDEOS.....	27
2.4. BIOSÍNTESE DE RAMNOLIPÍDEOS.....	31
2.5. PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FS).....	34
2.6. APLICAÇÕES DOS RAMNOLIPÍDEOS.....	38

<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
4.1. INTRODUÇÃO.....	46
4.2. EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	46
4.3. MICRORGANISMOS.....	47
4.4. MANUTENÇÃO DAS CEPAS.....	48
4.5. ENSAIOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA UFPEDA 614 E POR OUTRAS CEPAS DE MICRORGANISMOS.....	48
4.5.1 MEIOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	48
4.6. ESTUDOS DA PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FS).....	49
4.6.1. EFEITO DA RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO (C/N) NA PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE.....	49
4.6.2.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4.7. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO BIOSURFACTANTE.....	51
4.7.1. EXTRAÇÃO.....	51
4.7.2. PURIFICAÇÃO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	52
4.7.2.2. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA.....	52
4.8. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	52
4.8.2. TESTE COLAPSO DA GOTA.....	53
4.8.3. DETERMINAÇÃO DA TENSÃO SUPERFICIAL E DA TENSÃO INTERFACIAL.....	53
4.8.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA – CMC.....	54
4.8.5. MEDIDA DO ÍNDICE DE EMULSIFICAÇÃO (E %).....	54
4.8.6. DOSAGEM DE AÇÚCARES PELO MÉTODO DO FENOL-SULFÚRICO.....	54
4.8.7. QUANTIFICAÇÃO DE GLICEROL.....	55
4.8.8. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	57
4.9. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	57
4.9.1. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM).....	58
4.9.2. ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	58
4.9.3. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA.....	59
4.10. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	59
4.10.1. METILAÇÃO.....	59
4.10.2. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	60
4.10.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS – ESI-MS (ELECTROSPRAY-IONISATION-MASS-SPECTROMETRY).....	60
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
5.1. ENSAIOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR DIFERENTES MICRORGANISMOS.....	63
5.2. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA UFPEDA 614.....	66
5.2.1. EFEITO DA RELAÇÃO CARBONO/NITROGÊNIO NO MEIO CONTENDO GLICEROL COMO INDUTOR.....	66
5.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA PRODUÇÃO DE RAMNOLÍPÍDEOS POR DELINEAMENTO FATORIAL.....	69
5.4. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSURFACTANTE.....	75
5.4.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	75
5.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL.....	77
5.5.1. PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES CONTIDAS NA MISTURA DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA UFPEDA 614.....	77
5.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES.....	78
5.6.1. ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS E CARBOIDRATOS.....	78
5.7. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GLICOLÍPÍDEOS.....	81
5.7.1. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	81
5.7.2. ESPECTROMETRIA DE MASSA POR IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY (ELECTROSPRAY-IONISATION-MASS-SPECTROMETRY, ESI-MS) DAS FRAÇÕES ISOLADAS DO BIOSURFACTANTE (F <sub>1</sub> E F <sub>2</sub> ).....	85
5.7.3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS REFERENTES À CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTRUTURAL DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA UFPEDA 614.....	90
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>96</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>98</b>

<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>99</b>
ANEXO 1.....	108
ANEXO 2.....	114

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estruturas químicas de alguns tipos de biosurfactantes.

**Figura 2.** Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com a concentração do tensoativo.

**Figura 3.** Biossíntese de ramnolipídeo por *Pseudomonas aeruginosa*.

**Figura 4.** Curva padrão de açúcares totais por ramnose (mg/L) x absorvância a 480nm, construída utilizando o método de Dubois et al. (1956).

**Figura 5.** Reação química do glicerol com formaldeído formando o complexo colorimétrico 3,5-1,4-diidrolutidina (410nm), pelo método Soloni-Modificado

**Figura 6.** Curva-padrão de glicerol construída utilizando-se o método colorimétrico-químico Soloni-Modificado.

**Figura 7.** Esquema geral das análises de ácidos graxos e a composição monossacarídica realizadas no extrato purificado do sobrenadante de cultura de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614.

**Figura 8.** Seleção de microrganismos produtores de biosurfactantes: Método do espalhamento da gota – 1, 2: água deionizada; 4, 5: *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614; 7, 8: meio de cultura sem o inóculo; 10,11: *Burkholderia cepacia* LTEB11.

**Figura 9.** Variação da tensão superficial e produção de ramnose durante a fermentação de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Condições do ensaio: Meio de cultura: – 1,0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3,0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7,0 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , e glicerol (3%, v/v) , pH 7,0, 30° C.

**Figura 10.** Cromatografia em camada delgada (CCD) do sobrenadante de cultura (216 h de fermentação) produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. – 1: ramnose; 2: galactose; 3 e 4: sobrenadante de cultura - Sistema de solventes  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O (65:25:4), desenvolvimento das bandas com orcinol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Figura 11.** Distribuição dos resíduos fornecidos pelo modelo quadrático (Equação 2).

**Figura 12.** Otimização da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Superfície de resposta para os efeitos  $\text{FeSO}_4$  ( $X_3$ ) e Glicerol ( $X_1$ ) na resposta Ramnose ( $Y$ ), fixando-se a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_2$ ) = -1 (1 g/L).

**Figura 13.** Superfície de resposta para os efeitos  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_2$ ) e glicerol ( $X_1$ ) na resposta ramnose ( $Y$ ) por *P. aeruginosa* UFPEDA 614, fixando-se a concentração de  $\text{FeSO}_4$  ( $X_3$ ) = -1 (0 g/L).

**Figura 14.** Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) em função da tensão superficial (mN/m), utilizando-se diferentes diluições do sobrenadante de cultura contendo o biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614.

**Figura 15.** Índice de Emulsificação ( $E$ , %) do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 com vários hidrocarbonetos após 24 h ( $\square$ ) e após 30 dias ( $\blacksquare$ ). Os resultados representam valores médios de duplicatas

**Figura 16.** Cromatografia em camada delgada preparativa da amostra purificada (diluída 10 vezes) do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Sistema de solventes  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (65:15:2), desenvolvido com orcinol: $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $F_1$ ,  $R_f$  0,71;  $F_2$ ,  $R_f$  0,36.

**Figura 17.** Espectro parcial de 2 D RMN (HMQC) dos glicolipídeos presentes na fração  $F_1$  (monoramnolipídeos) isolada do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. (B) região anomérica  $\delta$  4,683/96,1 sugerindo uma ligação  $\beta$ -L-Rhap ( $1' \leftrightarrow 1$ )-hidroxiácido graxo.

**Figura 18.** Espectro parcial de 2 D RMN (HMQC) dos glicolipídeos presentes na fração  $F_2$  (diramnolipídeos) isolada do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614;  $\delta$  4,746/94,9 ; 4,730/102,5, sugere as ligações  $\beta$ -L-Rhap ( $1' \leftrightarrow 1$ )-hidroxiácido graxo e  $\beta$ -L-Rhap ( $1'' \rightarrow 2'$ )- $\beta$ -L-Rhap.

**Figura 19.** Espectrometria de massa (ESI-MS), modo íon negativo dos monoramnolipídeos contidos em  $F_1$ . (A) Os íons mostram a provável estrutura: Rha- $\text{C}_8$ - $\text{C}_{10}$ /Rha- $\text{C}_{10}$ - $\text{C}_8$ , Rha- $\text{C}_{10}$ -

C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub> e Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>. **B)** Estrutura do monoramnolípido mostrando os perfis de quebra obtidos por *Collision-induced dissociation* (CID) a *m/z* 504.10. mostrando os perfis de quebra obtidos por CID a *m/z* 650.

**Figura 20.** Espectrometria de massa (ESI-MS), modo íon negativo dos diramnolípídeos contidos em F<sub>2</sub>. **(A)** Os íons mostram a provável estrutura: Rha<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>. **(B)** Estrutura do diramnolípido mostrando os perfis de quebra obtidos por *Collision-induced dissociation* (CID) a *m/z* 650.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Principais tipos de biosurfactantes produzidos por microrganismos.

**Tabela 2.** Composição e propriedades físico-químicas de ramnolípídeos produzidos por espécies do gênero *Pseudomonas*

**Tabela 3.** Usos sugeridos para tensioativos não-iônicos em relação aos valores de BHL (balanço hidrofílico-lipofílico)

**Tabela 4.** Produção de ramnolípídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em Fermentação Submersa

**Tabela 5.** Biosurfactantes e ramos industriais de aplicação

**Tabela 6.** Efeito da adição de biosurfactantes na recuperação de óleo (MEOR) em escala laboratorial.

**Tabela 7.** Descrição dos equipamentos utilizados nesse trabalho

**Tabela 8.** Principais reagentes utilizados nesse trabalho

**Tabela 9.** Valores reais e codificados para o Delineamento fatorial de Box-Behnken 3<sup>3</sup> incompleto

**Tabela 10.** Efeito da relação carbono para nitrogênio (C/N) na produção de biosurfactantes

(expressos em ramnose) e biomassa por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

**Tabela 11.** Produção de ramnolipídeos por diferentes cepas *Pseudomonas aeruginosa* em meios de cultura com glicerol como principal fonte de carbono

**Tabela 12.** Resultados experimentais do delineamento fatorial  $3^3$  incompleto com as variáveis codificadas aplicadas no estudo da otimização da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614

**Tabela 13.** Coeficientes de regressão para a resposta ramnose (g/L) obtidos a partir da Tabela 10

**Tabela 14.** Análise de Variância para a resposta ramnose considerando todos os termos do modelo

**Tabela 15.** Composição dos ácidos graxos presentes nos glicolipídeos (frações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>) produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

**Tabela 16.** Análise de acetatos de alditóis parcialmente O-metilados obtidos das frações metiladas (F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>) isoladas do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

**Tabela 17.** Dados espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos glicolipídeos (frações F<sub>1</sub>, monoramnolipídeos e F<sub>2</sub>, diramnolipídeos) contidos no biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 ( $\delta$  expressos em p.p.m)

**Tabela 18.** Composição química e abundância relativa da mistura de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

**Tabela 19.** Composição da mistura de ramnolipídeos produzidos por diferentes cepas *Pseudomonas aeruginosa*

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

AAPM	Acetatos de alditóis parcialmente metilados
Ac <sub>2</sub> O	Anidrido acético
BHL	Balanço hidrofílico-lipofílico
CCD	Cromatografia de camada delgada
CID	Collision-induced dissociation
CMC	Concentração micelar crítica
C/N	Relação carbono/nitrogênio
d.i.	diâmetro interno
DMF	Dimetilformamida
EMAGA	Ésteres metílicos de ácidos graxos acetilados
EI-EM	Electrospray-ionisation-mass-spectrometry
FS	Fermentação submersa
GC-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GPM	Glicosídeo Parcialmente O-metilado
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence Spectroscopy</i>
$J_{C-H}$	Acoplamento (medido em Hz) entre C e H
-L	pertencente à série L
MeOH	metanol
MEOR	microbial enhanced oil recovery
$m/z$	Relação entre massa molecular e carga
$Q_p$	Produtividade volumétrica
<i>Rhap</i>	Ramnopiranosídico (a)
Ram	ramnose
Rha-/Rha <sub>2</sub>	Representação de um monoramnolípido/diramnolípido
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de próton
rpm	rotação por minuto
<i>Rf</i>	relação entre a distância (cm) percorrida pelo desconhecido e a distância percorrida pela substância conhecida, na CCD
ROESY	<i>Rotating-Frame nuclear Overhauser spectroscopy</i>
RL	Ramnolípideos
TFA	Ácido trifluoracético
UFPEDA	Universidade Federal de Pernambuco Departamento de Antibióticos

TS	Tensão superficial
TI	Tensão interfacial
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total correlated spectroscopy</i> (espectroscopia de correlação total)
$Y_{p/x}$	Coeficiente de rendimento em relação a biomassa produzida
$Y_{p/s}$	Coeficiente de rendimento do produto em relação ao consumo de substrato
$Q_p$	Produtividade volumétrica

## RESUMO

A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, isolada em campos petrolíferos do Nordeste Brasileiro, produziu um biosurfactante do tipo ramnolípídeo, quando cultivada em glicerol como fonte de carbono e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Uma relação carbono-nitrogênio (C/N) elevada (55) resultou na maior produção de ramnolípídeos (3,9 g/L) (expressos em ramnose). Nestas condições o rendimento em relação à biomassa ( $Y_{PX}$ ) foi de 1,45 g/g e o rendimento em relação ao glicerol adicionado ( $Y_{p/s}$ ) foi de 0,37 g/g. A presença de ramnolípídeos reduziu a tensão superficial do meio de cultura, depois da centrifugação para remoção das células, para 27,3 mN/m.

As propriedades físico-químicas do biosurfactante presente no meio de cultura livre de células foram examinadas por tensiometria e pelo índice de emulsificação do tensoativo contra diferentes compostos apolares (gasolina, diesel, tolueno e querosene). O biosurfactante apresentou excelentes propriedades tensoativas, com uma baixa concentração micelar crítica (CMC 13,9 mg/L), sendo capaz de produzir emulsões dos hidrocarbonetos testados com elevada estabilidade após 24 h ( $E=60-86\%$ ) e que se mantêm estáveis ( $E=55$  a  $70\%$ ) por no mínimo 30 dias.

A estrutura da porção carboidrato do ramnolípídeo foi determinada por CG-MS aliada à espectroscopia de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) e espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D, 2D  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ . Os ácidos graxos hidroxilados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) como ésteres metílicos acetilados. Os resultados correspondentes à determinação estrutural da mistura de ramnolípídeos mostraram que *P. aeruginosa* UFPEDA 614, nas condições de cultivo deste trabalho, produziu uma mistura de ramnolípídeos, onde cada monoramnolípídeo possui o seu homólogo diramnolípídeo, perfazendo um total de 12 homólogos, que incluem monoramnolípídeos (6) Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> e Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> e diramnolípídeos (6) Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>. As técnicas analíticas utilizadas neste trabalho propiciaram a completa elucidação da composição do biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* UFPEDA 614, contribuindo para futuros

desenvolvimentos de aplicações de biosurfactantes produzidos por esta e por outras cepas nativas brasileiras.

**Palavra-Chave:** Ramnolipídeos; *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactantes

## ABSTRACT

A strain of *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 isolated from a petrochemical plant of Northeast Brazil produced a rhamnolipid biosurfactant when cultivated on glycerol as the sole carbon source and ammonium nitrate as the nitrogen source. A carbon to nitrogen ratio of 55 resulted in the highest concentration of rhamnolipids (expressed in terms of rhamnose) in the culture broth, 3.9 g/L. Under these conditions, the yield in relation to biomass ( $Y_{PX}$ ) was 1.45 g/g while the yield in relation to the glycerol added ( $Y_{p/s}$ ) was 0.37 g/g. The presence of the rhamnolipids reduced the surface tension of the culture broth, after centrifugation to remove the cells, to 27.3 mN/m, as determined by tensiometry. Serial dilutions of this culture broth gave a critical micellar concentration of approximately 14 mg/L. The culture broth was able to produce stable emulsions of various hydrocarbons with emulsification index values of 60 to 80% after 24 h and 55 to 70% after 30 days. The maximum emulsification index, of 86.4%, was obtained with toluene after 24 h. The structure of the carbohydrate moiety of the glycolipid was determined by GC-MS analysis allied to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) 1D, 2D  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  spectroscopy. The hydroxyl fatty acids were analyzed by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS) of hydroxy-acetylated fatty acid methyl esters (HAFAME) derivatives. The positions of the fatty acids in the lipid moiety were variable, with 12 homologues namely six mono-rhamnolipids (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>, Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> and Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>) and six di-rhamnolipids (Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> and Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>). This work therefore resulted in the complete characterization of the biosurfactante produced by *P. aeruginosa* UFPEDA 614, and lays the basis for the development of applications of biosurfactants produced by this and other native Brazilian rhamnolipid-producing strains.

**Keywords:** Rhamnolipids; *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactants

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A grande maioria deles, disponível comercialmente, é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores, associado às novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (Nitschke e Pastore, 2002). Assim, biosurfactantes produzidos por microrganismos - bactérias, fungos ou leveduras - vêm recebendo considerável interesse nos últimos anos devido à sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e diversidade de aplicações. Dentre as aplicações comerciais dos biosurfactantes está a recuperação melhorada de petróleo (microbial enhanced oil recovery, MEOR), a biorremediação de solos contaminados com petróleo e seus derivados, a formulação de lubrificantes, além das diferentes utilizações na indústria de química fina, farmacêutica e de alimentos. Uma outra importante propriedade dos biosurfactantes é a sua capacidade de apresentar atividade biológica como antifúngicos e antibióticos, e que ainda não estão plenamente conhecidas (Mukherjee et al., 2006).

No caso do gênero *Pseudomonas*, os biosurfactantes são produzidos na forma de uma mistura de compostos homólogos, que determinam as suas propriedades tensioativas e atividades biológicas, e que por sua vez, irão definir as possibilidades de aplicação do biosurfactante. A composição da mistura de homólogos depende de alguns fatores, sendo os mais importantes a cepa utilizada e os meios e condições de cultura.

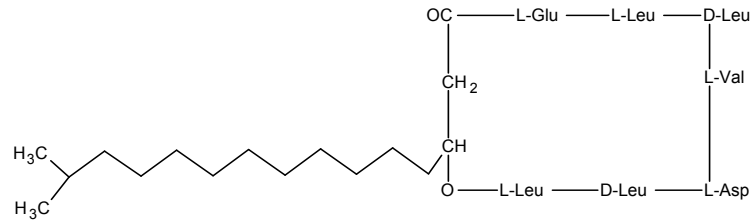
Dentro deste contexto, este trabalho estudou a produção de ramnolipídeos por uma nova cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 614) isolada em campos petrolíferos do Nordeste Brasileiro, usando o glicerol como principal fonte de carbono e determinando-se a composição molecular e estrutural da mistura de homólogos, a fim de estabelecer uma possível relação estrutura-função desses compostos com suas propriedades físico-químicas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

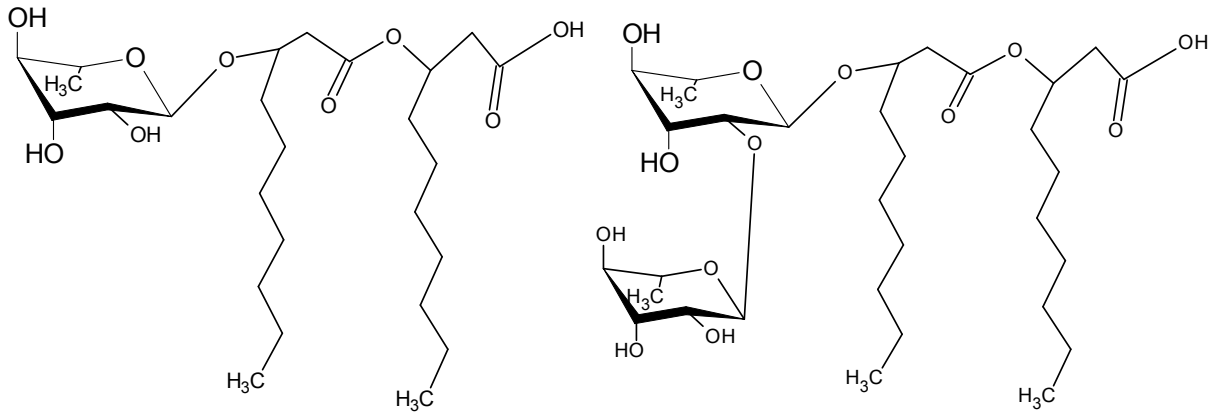
### 2.1. Biosurfactantes e Microrganismos Produtores

Os biosurfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, produzidos extra ou intracelularmente por microrganismos - bactérias, fungos ou leveduras - durante o processo de fermentação, com a finalidade de facilitar a difusão passiva de substâncias insolúveis em água, como por exemplo, hidrocarbonetos, para o interior da célula. São biodegradáveis, não tóxicos e podem ser produzidos *in situ* (por inoculação do próprio microrganismo no local de atuação do biosurfactante) ou *extra situ*, por adição do biosurfactante previamente produzido em outro local (Perfumo et. al., 2006; Mulligan, 2005; Makkar e Cameotra, 1997; Carrilo et al., 1996).

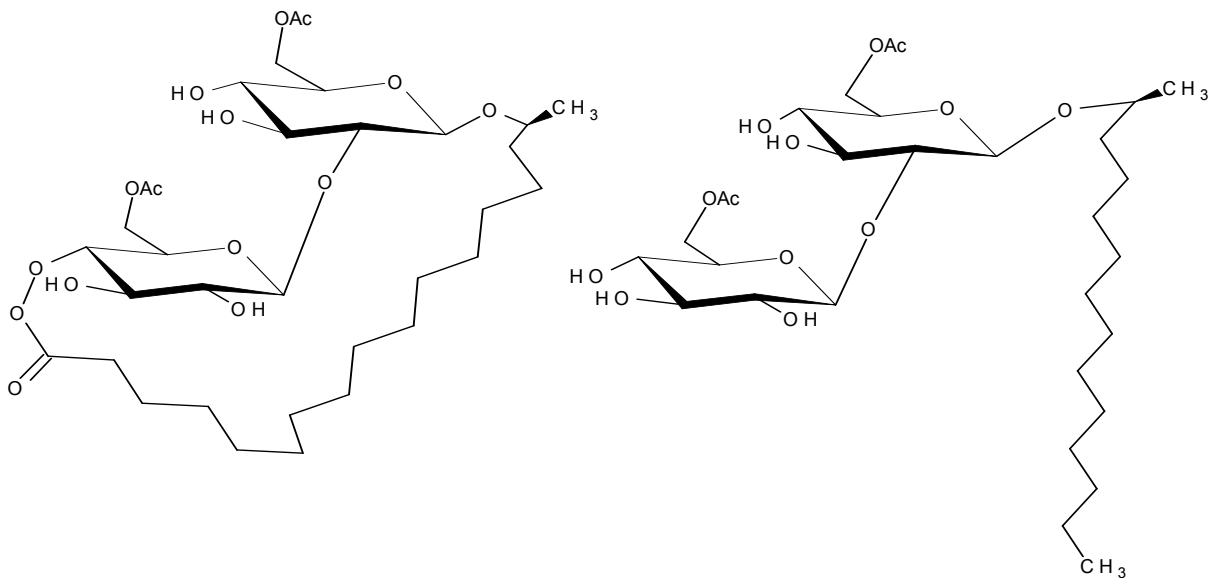
Os biosurfactantes são classificados de acordo com a sua composição química e origem microbiana. As principais classes incluem uma grande variedade de estruturas, como glicolipídeos, lipopeptídeos, complexos de polissacarídeos ou proteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros (Figura 1).



Surfactina produzida por *Bacillus subtilis*



Ramnolípídeos (monoramnolípídeo RL-1 (direita), diramnolípídeo RL-2 (esquerda) produzido por *Pseudomonas aeruginosa*



Soforolípídeos produzidos por *Candida bombicola*

**Figura 1.** Estruturas químicas de alguns tipos de biosurfactantes (Fonte: Lang, 2002)

Os biosurfactantes possuem uma estrutura comum: uma porção hidrofóbica, usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligada a uma porção hidrofílica, que pode ser um carboidrato, aminoácido, um grupo peptídeo cíclico, fosfato, carboxilato ou álcool (Tabela 1) (Mulligan, 2005). Desta forma, cada família de biosurfactantes pode apresentar propriedades e funções fisiológicas diferentes, sendo que a maioria é constituída por porções hidrofílicas e hidrofóbicas distintas (Sánchez et al., 2006; Christofi e Ivshina, 2002).

Uma variedade de microrganismos produz potente agente de superfície ativa, biosurfactantes, sendo os mais comumente estudados os pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*. Biosurfactantes variam nas propriedades químicas e tamanho molecular. Enquanto os surfactantes microbianos de baixa massa molar são em geral glicolipídeos, os de alta massa molar são heteropolissacarídeos ou complexos glicoprotéicos.

A Tabela 1 apresenta exemplos de biosurfactantes produzidos por microrganismos.

**Tabela 1.** Principais tipos de biosurfactantes produzidos por microrganismos

TIPO DE BIOSURFACTANTE	MICRORGANISMO PRODUTOR
<b>Glicolípídeos</b>	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Rhodococcus ruber</i>
Trealose micolato	<i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium phlei</i> <i>Mycobacterium fortitum</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycobacterium paraffinicum</i>
Micolatos de mo, di e trisacarídeos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i>
Ramnolípídeos	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolípídeos	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Torulopsis apicola</i> , <i>Candida spp.</i>
Diglicosil diglicerídeo	<i>Lactobacillus fermentii</i> <i>Arthrobacter spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
<b>Fosfolípídeos e ácidos graxos</b>	<i>Candida spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Talamyces trachyspermus</i> <i>Penicillium spiculisporum</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Corynebacterium insidiosum</i> <i>Corynebacterium alkanolyticum</i> <i>Rhodotorula glutinus</i> <i>Rhodotorula graminus</i> <i>Capnocytophaga spp.</i>
<b>Lipopeptídeos e Lipoproteínas</b>	
Serrawetina	<i>Serratia. marcenscens</i>
Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
Polirnixinas	<i>Bacillus polymyxas</i> <i>Pseudomonas rubescens</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i>
Subtilisina e Sufactina	<i>Bacillus subtilis</i>
Lichesina	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Arthrobacter sp.</i> <i>Bacillus pumilis</i>
<b>Surfactantes Poliméricos</b>	
Emulsan e Biodispersan	<i>Arthrobacter calcoaceticus RAG-1</i> <i>Arthrobacter calcoaceticus A2</i> <i>Arthrobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida petrophilum</i>

**Tabela 1.** Principais tipos de biosurfactantes produzidos por microrganismos (Continuação)

TIPO DE BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO PRODUTOR
Surfactantes Poliméricos	<i>Endomycopsis lipolytica</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Shizonella melanogramma</i> <i>Ustilago maydis</i> <i>Candida antártica T-34 e KCTC 7804</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Debaryomyces polymorphus</i>

Adaptada: Santos (2003), Christofi e Ivshina (2002), Lang (2002), Mulligan et al. (2001).

O interesse por biosurfactantes está baseado na gama de propriedades funcionais que estes compostos possuem que por sua vez dependem da composição da mistura. Além de serem não-tóxicos ou de baixa toxicidade e biodegradáveis, a diversidade enorme destes compostos torna-os interessantes para a aplicação em diversas áreas, principalmente no controle da poluição por compostos oleosos, na produção de compostos químicos, no uso como aditivos para remediação ambiental, e no uso como agente de controle biológico (Soberón-Chávez et al., 2005; Lang e Wullbrandt, 1999). Estas aplicações serão discutidas em detalhes em 2.6.

## 2.2. Estrutura dos Ramnolipídeos

Ramnolipídeos constituem a classe de biosurfactantes produzidos principalmente por espécies do gênero *Pseudomonas*, dentre as quais se encontra *P. aeruginosa*, que é uma bactéria encontrada em diferentes *habitats*, como a água, solo, tecidos animais e vegetais, podendo ser um patógeno humano oportunista, causador de sérias infecções hospitalares (Lyczak et al., 2000).

São produzidos como uma mistura de homólogos, que somente mais recentemente tiveram a sua composição esclarecida. A composição da mistura depende das condições de cultura, (composição dos substratos, pH, temperatura), da idade da cultura e das linhagens utilizadas.

A produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* foi relatada primeiramente por Jarvis e Johnson (1949). Nesse trabalho, que utilizou a acetilação e oxidação por periodato, e a cepa *P. aeruginosa* 141 crescida em glicerol e peptona, demonstrou-se a presença da ligação glicosídica do  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato a duas moléculas de L-ramnose. Entretanto, o tipo de ligação entre os dois açúcares só foi

elucidada mais tarde por Edwards e Hayashi (1965), que, utilizando a metilação, e oxidação por periodato, demonstraram que a ligação era do tipo 1,2.

O primeiro diramnolipídeo (Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) foi identificado quando *P. aeruginosa* S7B1 foi cultivada em hidrocarbonetos de cadeia C<sub>14</sub> a C<sub>18</sub> (Hisatsuka et al., 1971), enquanto o monoramnolipídeo (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) foi isolado de culturas de *P. aeruginosa* KY4025 cultivadas em *n*-alcanos (Itoh et al., 1971).

Mais tarde, outros dois ramnolipídeos, Rha-C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> com apenas uma unidade de β-hidroxidecanoato foram detectados ao final do experimento com células em descanso de *P. aeruginosa* DSM 2874 por Sylдатk et al.<sup>1</sup> citado por Nitschke et al., 2005.

A partir daí, muitos trabalhos foram publicados sobre a produção de ramnolipídeos por cepas de *Pseudomonas* e sobre o estudo da composição da mistura e suas propriedades físico-químicas (Tabela 2). Note-se que os trabalhos citados na Tabela 2 nem sempre tiveram os mesmos objetivos ou utilizaram metodologias suficientemente sofisticadas para permitir a elucidação completa da composição da mistura. Dos citados na Tabela 2 estão os trabalhos de Parra et al. (1989) e Sylдатk et al. (1985).

**Tabela 2.** Composição e propriedades físico-químicas de ramnolipídeos produzidos por espécies do gênero *Pseudomonas*

Cepa	Tipo de Ramnolipídeo	TS (mN/m)	TI (mN/m)	CMC (mg/L)	Referências
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2	RL misturas	32,8	1 <sup>a</sup>	108,8	Haba et al., 2003a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	28,8	ND	105,0	Abalos et al. 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	RL misturas <sup>c</sup>	27,3	ND	234	Abalos et al. 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10	RL misturas <sup>d</sup>	26,8	ND	150	Abalos et al. 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI	RL misturas	24,0	1,31 <sup>b</sup>	120	Benincasa et al. 2004

<sup>1</sup> Sylдатk, C.; Lang, S.; Matulovic, U.; Wagner, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from *n*-alcanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. **Z. Naturforsch.** 4v. 40c, p. 61-67, 1985

**Tabela 2.** Composição e propriedades físico-químicas de ramnolipídeos produzidos por espécies do gênero *Pseudomonas* (Continuação)

Cepa	Tipo de Ramnolipídeo	TS (mN/m)	TI (mN/m)	CMC (mg/L)	Referências
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 44T1	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	25,0	0,2 <sup>a</sup>	11	Parra et al. 1989
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 44T1	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	25,0	1,0 <sup>a</sup>	11	Parra et al. 1989
<i>Pseudomonas</i> sp. 44T1	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> + Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	26,0	< 1,0 <sup>b</sup>	20	Parra et al. 1989
<i>Pseudomonas</i> SP. DSM2874	RL mistura	28,0	< 1,0 <sup>b</sup>	20	Syldatk et al. 1985
<i>Pseudomonas</i> SP. DSM2874	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	27,0	< 1,0 <sup>b</sup>	10	Syldatk et al. 1985
<i>Pseudomonas</i> SP. DSM2874	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub>	30,0	< 1,0 <sup>b</sup>	200	Syldatk et al. 1985
<i>Pseudomonas</i> SP. DSM2874	Rha-C <sub>10</sub>	25,0	< 1,0 <sup>b</sup>	200	Syldatk et al. 1985
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UG-2	Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub> + Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	31,0	ND	53	Mata-Sandoval et al. 2001

contra querosene, b – contra hexadecano, c – Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> + Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> + Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> + Rha-C<sub>12:1</sub>-C<sub>10</sub> + Rha-C<sub>12:2</sub> + Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>2</sub>, d- Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> + Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> + Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> + Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> + Rha-C<sub>12:1</sub>-C<sub>10</sub> + Rha-C<sub>8:2</sub>, e Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>; Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>; Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>; Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>; Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>; Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>; Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>; Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>; Rha<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>; Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>; Rha<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>; Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>, RL – ramnolipídeos, TS – tensão superficial, TI – tensão interfacial, CMC – concentração micelar crítica. ND- não determinado. FONTE: Nitschke et al, 2005; Soberón-Chavez, 2005; Déziel et al. 2000.

Atualmente, confirmou-se que os dois grupos principais de ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* em culturas líquidas como parte de mistura de ramnolipídeos são o monoramnolipídeo Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> e o diramnolipídeo Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> (Soberón-Chavez et al., 2005; Mata-Sandoval et al., 2001; Maier e Sóberon-Chávez, 2000). Esses compostos são constituídos, respectivamente, de uma ou duas unidades de ramnose ligadas a uma ou duas unidades de ácido β-hidroxidecanoato de diferentes comprimentos, podendo conter ou não duplas insaturações. As várias combinações desses grupos geram uma grande variedade de possíveis misturas de ramnolipídeos.

Os métodos usados na identificação dos ramnolipídeos são de crucial

importância na elucidação das estruturas e geralmente envolvem inicialmente uma separação cromatográfica das misturas em várias frações por cromatografia em camada delgada, seguidas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Essas frações semi-purificadas são então analisadas por espectrometria de massa, e mais frequentemente por “*fast atom bombardment ionisation*” (FAB) (Déziel et al., 2000).

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa (HPLC/MS) permitiu identificar mais de 28 homólogos da mistura de ramnolipídeos produzidas por *P. aeruginosa* 57RP quando cultivadas em manitol e naftaleno. Os homólogos identificados possuíam ácidos graxos de diferentes comprimentos ( $C_8$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ), e alguns ácidos graxos com duplas insaturações ( $C_{12:1}$ ) (Déziel et al., 1999).

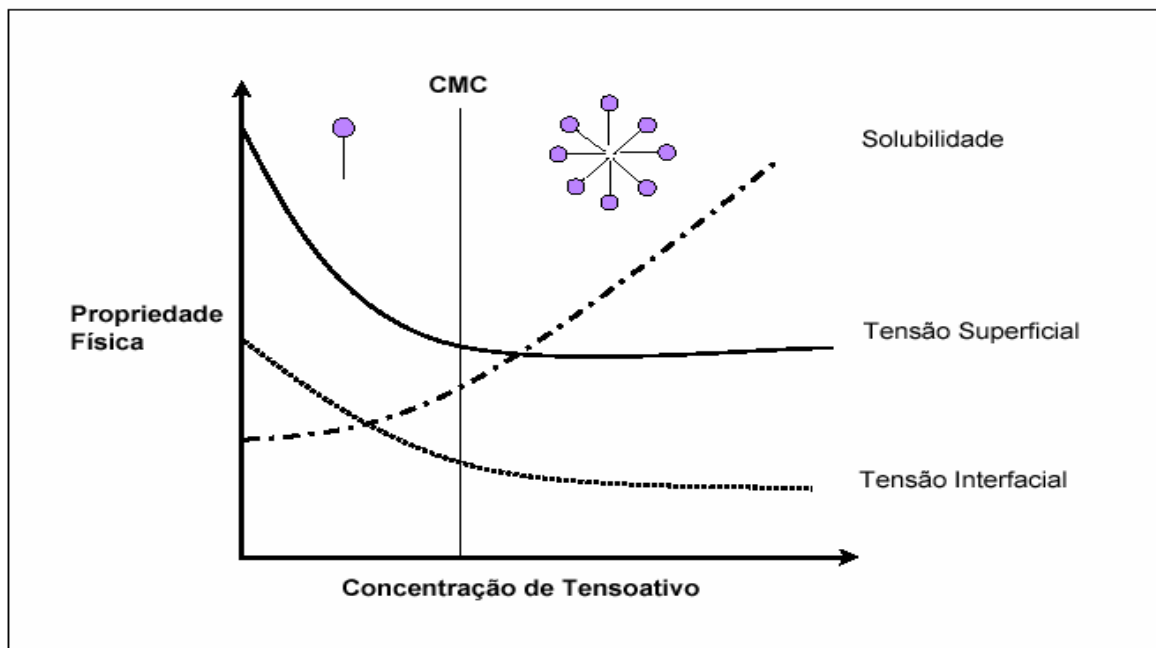
Haba et al. (2003)b conseguiram isolar e identificar por HPLC/MS mais de 11 homólogos produzidos por *P. aeruginosa* 47T2 quando cultivada em resíduos de óleo de frituras. Os homólogos presentes possuíam ácidos graxos de diferentes comprimentos ( $C_8$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{12}$ ), e alguns ácidos graxos com duplas insaturações ( $C_{12:1}$  e  $C_{14:1}$ ).

Embora os métodos usados para isolar e caracterizar quimicamente forneça excelentes informações da estrutura dos diferentes ramnolipídeos, há que se considerar que eles podem dar informações incompletas do perfil das misturas, pois alguns homólogos podem perder-se durante as várias etapas de purificação requeridas.

### 2.3 Propriedades dos Ramnolipídeos

As propriedades físico-químicas das misturas de ramnolipídeos estão mostradas na Tabela 2. O interesse recente por biosurfactantes, principalmente os ramnolipídeos, deve-se às suas propriedades tensioativas e emulsionantes, por meio das quais promovem a solubilização de substratos hidrofóbicos, principalmente hidrocarbonetos como os *n*-alcanos (Singh et al., 2007; Mulligan, 2005). Se a composição da mistura de ramnolipídeos for elucidada, a contribuição individual de cada um dos homólogos nas suas propriedades físicas pode ser estabelecida, sendo possível obter uma mistura com propriedades desejáveis para usos específicos (Sánchez et al., 2006).

Os indicadores mais largamente utilizados para medir a atividade surfactante são os parâmetros tensão superficial, tensão interfacial e a concentração micelar crítica (CMC). As tensões superficial e interfacial referem-se ao posicionamento das moléculas nas interfaces ar/líquido e líquido/líquido respectivamente, com uma orientação específica também conhecida como adsorção. A CMC é definida como a máxima concentração de surfactante com propriedades tensioativas onde, a partir dessa concentração, inicia-se a formação de micelas, que conferirá as propriedades de detergência e solubilização ao composto (Figura 2). Em concentrações acima da CMC, o tensioativo aumenta a solubilidade de compostos orgânicos cuja solubilidade em água é baixa (i.e., o composto orgânico é incorporado no interior da micela); contudo, a tensão superficial e a interfacial da solução permanecem constantes. Esse parâmetro indica se o biosurfactante é um bom redutor de tensão superficial, e quanto menor é o valor de CMC, maior a eficiência do biosurfactante (Mulligan, 2005; Christofi e Ivshina, 2002).



**Figura 2.** Diagrama esquemático da variação da tensão superficial, interfacial e solubilidade do composto orgânico com a concentração do tensioativo. Fonte: Adaptada Mulligan (2001).

Os ramnolipídeos são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 25 a 30 mN/m e tensão interfacial óleo/água de 43 mN/m para valores menores que 1 mN/m, apresentando concentração micelar crítica (CMC) de 10 -200

mg/L (Tabela 2).

As propriedades surfactantes variam de acordo com a composição e a distribuição de cada homólogo produzido, e são determinadas pela espécie bacteriana, condições de cultura e a composição do meio (Haba, et al., 2003a, Déziel et al., 2000). A relação entre os homólogos, a presença de duplas insaturações, o comprimento da cadeia alquílica e o tamanho da cadeia hidrofílica podem afetar as propriedades físicas do biosurfactante.

Um anel de L-ramnose confere maior hidrofiliabilidade ao ramnolípido, enquanto carbonos adicionais à cadeia de ácido graxo ou maior número de insaturações aumentam sua hidrofobicidade. Alguns autores sugerem que, quanto maior a cadeia de ácidos graxos e mais insaturados forem, maior a chance destas moléculas agregarem-se em micelas, diminuindo a CMC, quando comparadas a misturas de ramnolípidos ricos em ácidos graxos saturados (cadeia C<sub>10</sub>) (Nitschke et al., 2005).

A predominância de mono ou diramnolípidos e a sua relação com as propriedades físico-químicas da mistura não estão bem esclarecidas, mas algumas evidências podem ser observadas. Por exemplo, os diramnolípidos do tipo Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> geralmente apresentam uma CMC mais baixa (5 mg/L), devido à presença de duas moléculas de açúcar; em contrapartida, alguns monoramnolípidos, como Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> por exemplo, podem apresentar valores de CMC de 40 mg/L, enquanto os Rha-C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> apresentaram uma CMC de 200 mg/L (Nitschke et al., 2005, Lang, 2002).

Note-se, entretanto, que os resultados das propriedades em função da composição da mistura variam bastante.

Mata-Sandoval et al. (1999) encontraram em misturas de ramnolípidos de *P. aeruginosa* UG2 cultivadas em óleo de milho, ricas em Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, valores de CMC de 37 mg/L e tensão superficial de 36 mN/m, e em misturas com alto conteúdo de Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, valores de CMC de 53 mg/L e tensão superficial de 31 mN/m.

Haba et al. (2003a) relataram uma mistura de ramnolípidos contendo 18,95% de ácidos graxos insaturados (C<sub>12:1</sub> e C<sub>14:1</sub>), com tensão superficial de 32 mN/m e uma CMC de 108,8 mg/L, valores estes maiores do que as misturas contendo apenas ácidos graxos saturados. Similarmente, Benincasa et al. (2004) relataram a mistura

de ramnolipídeos contendo 31% de ácidos graxos insaturados com uma CMC de 120 mg/L e tensão superficial de 24 mN/m.

Uma outra característica importante dos biosurfactantes é o balanço hidrofílico-lipofílico (BHL), que é conferido pela composição da mistura. BHL é uma expressão numérica relativa da atração simultânea do emulsificante pela água e pelo óleo, cujo valor informa a solubilidade do emulsificante em óleo ou água. Em geral, as moléculas com baixo BHL são lipofílicas, enquanto as de BHL alto são mais solúveis em água (Christofi e Ivshina, 2002). A Tabela 3 ilustra as aplicações de tensioativos não-iônicos com diferentes valores de BHL.

**Tabela 3.** Usos sugeridos para tensioativos não-iônicos em relação aos valores de BHL (balanço hidrofílico-lipofílico)

BHL	USOS
< 3	Filmes de superfície
3 - 6	Emulsificantes água em óleo (a/o)
7 - 9	Espalhamento de líquidos em superfícies sólidas
8 -15	Emulsificantes óleo em água (o/a)
13 -15	Detergentes
15 -18	Solubilidade

Fonte: Christofi e Ivshina, 2002.

Outra propriedade dos ramnolipídeos está relacionada com a sua habilidade de emulsificar hidrocarbonetos e estabilizar emulsões, que é traduzida pelo parâmetro Índice de Emulsificação ( $E$ ), que é medido pelo percentual da altura da camada emulsionada pela altura total do líquido. Emulsões de *n*-alcanos, como petróleo bruto, querosene, óleos de oliva e coco foram estabilizadas por ramnolipídeos, mostrando uma perda de 5 a 25% da estabilidade depois de 24 h, dependendo da fonte de carbono (Patel e Desai, 1997). Haba et al., (2003a) relataram que os sobrenadantes de culturas obtidas de diferentes gêneros de *Pseudomonas* foram capazes de formar emulsões com o querosene, que permaneceram estáveis por mais de três meses.

Uma outra propriedade de biosurfactantes, especialmente de lipopeptídeos do tipo Sufactina, e em menor grau para ramnolipídeos diz respeito à atividade biológica destes compostos. Atividades antifúngicas, antibacterianas foram

reportadas para diversas misturas de ramnolipídeos (Benincasa et al., 2004; Haba et al., 2003b; Abalos et al., 2001).

#### 2.4. Biossíntese de Ramnolipídeos

A biossíntese dos ramnolipídeos é um processo complexo que envolve várias enzimas, cujo entendimento pode levar a uma melhor compreensão dos fatores que contribuem para a produção da mistura destes compostos em cepas de *Pseudomonas*.

A biossíntese de ramnolipídeos baseia-se numa seqüência de três reações (Figura 3). A primeira reação envolve a síntese *de novo* do ácido graxo, na qual a enzima responsável pela síntese dos ácidos graxos é ramnosiltransferase A - **RhIA**. (E.C. 2.4.1.159). A segunda reação é catalisada pela ramnosiltransferase B – **RhIB**, que utiliza a timidina-difosfato-L-ramnose (dTDP-L-ramnose) como doadora e o  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato, (HAA) como aceptor, produzindo o monoramnolipídeo. A última reação envolve uma outra ramnosiltransferase C – **RhIC**, que é responsável pela síntese do diramnolipídeo. Os genes que codificam a biossíntese, regulação e indução da **RhIB** estão organizados em um grupo operon denominado *rhlABRI*, que se localiza no cromossomo de *P. aeruginosa*. Os genes envolvidos na codificação da **RhIC**, entretanto, ainda não se encontram devidamente caracterizados (Soberón-Chávez et al., 2005).

Para a síntese da porção açúcar do biosurfactante, inicialmente a dTDP-L-ramnose é sintetizada através de uma série de reações enzimáticas, que consistem na conversão da D-glucose-1-fosfato via dTDP-glucose, dTDP-4-ceto-6-deoxi-D-glucose, e dTDP-4-ceto-6-deoxi-L-manose (Figura 3). Essas conversões são catalisadas em *P. aeruginosa* pelo grupo gênico *rml* agrupado em um operon (*rmlABCD*) (Soberón-Chávez et al., 2005).

A síntese dos ácidos graxos dos ramnolipídeos diverge da biossíntese dos ácidos graxos de *P. aeruginosa* em nível da redução aceto-acil (Campos-García et al., 1998). A enzima responsável pelos precursores dos ácidos graxos dos ramnolipídeos é chamada **RhIG** ( $\beta$ -cetoacil-ACP redutase) e o doador de elétrons NADPH. A **RhIG** está especificamente envolvida na produção de ramnolipídeos e também na síntese dos polihidroxialcanoatos (PHAs). Recentemente, Bredenbruch et al. (2005) reportaram que a **RhIG** também estaria envolvida na produção da

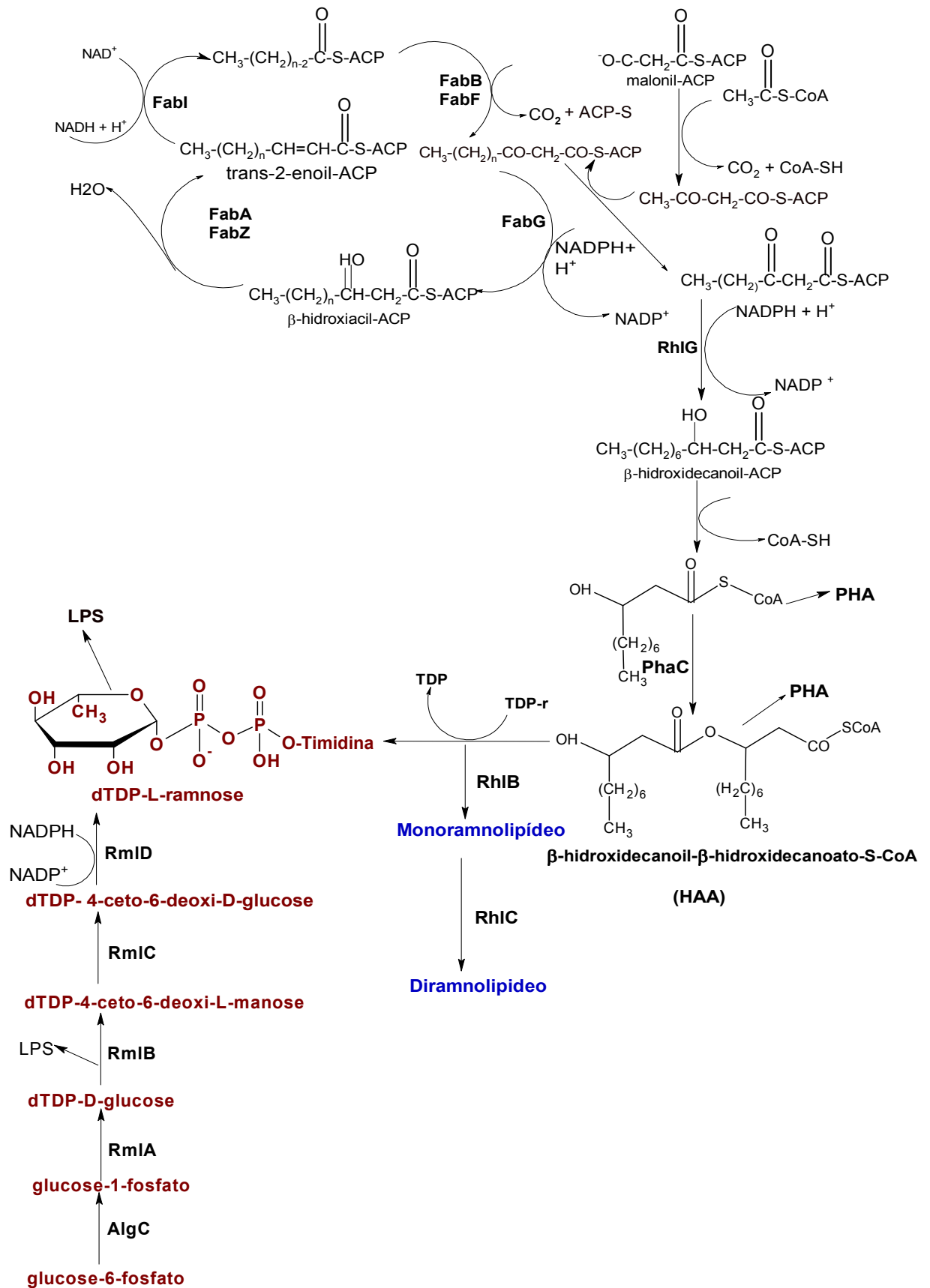
proteína transportadora de grupo acila-(ACP), que é precursora dos ácidos graxos e na síntese de homoserina lactonas (HAQs).

Os PHAs são compostos de reserva armazenados na forma de grânulos intracelulares por muitas bactérias. Em *P. aeruginosa* estes grânulos são encontrados na forma de polímeros de  $\beta$ -hidroxidecanoato. O ácido mais abundante encontrado em PHAs é o  $\beta$ -hidroxidecanoato (C<sub>10</sub>), e é também o ácido graxo mais encontrado nos ramnolipídeos e nos HAAs. Os PHAs são sintetizados pela polimerização do  $\beta$ -hidroxiácidos catalisados pela **PhaC** (polihidroxiacanoatos sintetases), com a coenzima-A ligada a ácidos graxos como substratos (Figura 3).

Inicialmente, a síntese do  $\beta$ -hidroxidecanoato, catalisada pela **FabH** (acetil-CoA-ACP transacetilase) requer o grupo acetil do acetil-CoA e a proteína transportadora malonil-ACP para formar o acetoacetil-ACP. Na etapa subsequente ocorre a condensação do malonil-ACP com acil-ACP catalisadas pelas **FabB** e **FabF** ( $\beta$ -cetoacil-ACP-sintase I e II), respectivamente. O segundo passo, o  $\beta$ -ceto-éster formado no primeiro passo, é reduzido para  $\beta$ -hidroxiacil-ACP. Essa reação é catalisada pela **FabG** ( $\beta$ -cetoacil-ACP redutase) e o doador de elétrons NADPH. O terceiro passo do ciclo é catalisado por uma **FabA** ou **FabZ** ( $\beta$ -hidroxiacil-ACP desidratase). O quarto e último passo é a redução do trans-2-enoil-ACP para acil-ACP, pela ação da **FabI** (enoil-ACP redutase), de novo, o NADPH é o doador de elétrons (Campos-García et al., 1998).

Como mostrado na Figura 3, a cada volta do ciclo, o composto resultante é alongado em uma unidade acila. Quando o  $\beta$ -hidroxidecanoato é finalmente sintetizado ele é reduzido pela ação da **RhIG**, de forma similar à reação catalisada pela **FabG** na produção de  $\beta$ -hidroxiácidos.

A **PhaB** ( $\beta$ -cetoacil-CoA redutase) é responsável pela etapa de redução na produção dos  $\beta$ -hidroxiácidos. O  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (HAA) formado servirá então como substrato para produção do monoramnolipídeo pela ação da **RhIB**, responsável pela transferência dTDP-ramnose para o HAA. O monoramnolipídeo produzido pode ainda ser adicionado de mais uma ramnose pela ação catalítica da **RhIC**, gerando o diramnolipídeo (Santos, 2003).



**Figura 3.** Biossíntese de ramnolípídeos por *Pseudomonas aeruginosa*. Adaptada de Campos-Garcia et al., (1998), Maier e Sobéron-Chávez (2000), Sobéron-Chávez et al., (2005).

## 2.5. Produção de Rhamnolipídeos Por *Pseudomonas aeruginosa* em Fermentação Submersa (FS)

Para a produção de biosurfactantes em larga escala é necessário investigar, algumas etapas preliminares fundamentais: seleção de cepas e eventual melhoramento genético, parâmetros físico-químicos e nutricionais e numa última etapa, a estratégia de fermentação, que permita o escalonamento do processo e a solução de eventuais problemas inerentes à manipulação e produção do microrganismo e seus produtos (Santos, 2003, Lang e Wullbrandt, 1999).

Abordaremos a seguir apenas os parâmetros físico-químicos e nutricionais relativos à fermentação.

Quando se planeja a formulação de um meio de cultivo para produção de biomassa ou metabólito secundário por um microrganismo selecionado, vários elementos que compõem ou caracterizam esse meio de cultivo devem ser considerados (Nitschke et al., 2005; Santos, 2003). Entre estes parâmetros estão as fontes de carbono, nitrogênio e os íons multivalentes, e outros (pH, temperatura, força iônica, oxigênio dissolvido, micro elementos e qualidade da água) relacionados com a composição do meio de cultivo.

A literatura aponta uma ampla diversidade de fontes de carbono utilizadas para produção de rhamnolipídeos por diferentes cepas de *Pseudomonas* (Tabela 4). Fontes de carbono solúveis em água como glicerol, glucose, manitol e etanol foram usadas na produção de rhamnolipídeos. Entretanto, resultados mais expressivos foram obtidos em fontes insolúveis como *n*-alcanos e óleos vegetais.

Por exemplo, Wullbrandt et al.<sup>2</sup> citado por Lang e Wullbrandt (1999), utilizando o óleo de soja, relataram a máxima concentração de rhamnolipídeo de 78 g/L e 112 g/L. Entretanto, os textos originais que trazem estes resultados foram publicados em livros alemães de circulação restrita e de difícil obtenção, o que somado aos valores bem inferiores obtidos por todos outros autores em publicações em periódicos de grande confiabilidade, acabam por comprometer a credibilidade destes resultados.

---

<sup>2</sup> Wullbrandt D.; C. Giani, J.; Mixich, M.; Kunz, K.M.; Rapp, K.M.; Vpigel, M. L-rhamnose durch fermentation phanzlicher Öle. IN: DECHEMA (ed) Kurzfassugen der 23. Jahrestagung der Biotechnologen, Frankfurt. DECHEMA. (3s), 1994.

Matsufuji et al.<sup>3</sup>, citados por Nitschke et al., (2005), (Tabela 4) realizaram fermentações em batelada alimentada com *P. aeruginosa* IFO 3924 utilizando o etanol como fonte de carbono, e ao final de sete dias obtiveram 32 g/L de ramnolipídeos. Porém, os autores observaram que teores maiores que 3% de etanol apresentavam alta toxicidade à bactéria.

Diferentes fontes de carbono têm sido utilizadas para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa*, mas parece que há uma necessidade de se manter uma limitação da fonte de nitrogênio (alta relação C/N) para a melhor produção do biosurfactante. Guerra-Santos et al. (1984), em um estudo de produção de ramnolipídeos em fermentação contínua, utilizando glucose como fonte de carbono, mostraram que a fonte de carbono é consumida para a multiplicação celular e conseqüente incremento na biomassa, enquanto que a limitação de nitrogênio estimula a formação de ramnolipídeos.

Em relação às fontes de nitrogênio, a cepa *P. aeruginosa* é capaz de utilizar tanto fontes orgânicas e complexas, como sais inorgânicos. A fonte de nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas estruturais e enzimas, e, portanto, fundamental para o crescimento celular e a manutenção da maquinaria enzimática (Santos, 2003). A produção de ramnolipídeos é inibida pela presença de  $\text{NH}_4^+$ , glutamina, asparagina, arginina e promovida pelos íons  $\text{NO}_3^-$ , glutamato e aspartato (Soberón-Chávez et al., 2005).

O uso de  $\text{NO}_3^-$  foi encontrado como melhor fonte de nitrogênio para produção de ramnolipídeos (Arino et al., 1996; Manresa et al., 1991; Venkata e Karanth, 1989; Robert et al., 1989).

Como afirmado anteriormente, a síntese de ramnolipídeos está associada à limitação de nitrogênio (Soberón-Chávez et al., 2005; Manresa et al., 1991; Venkata e Karanth, 1989; Guerra-Santos et al., 1984). A possível explicação para o fato de *P. aeruginosa* sintetizar maiores quantidades de ramnolipídeos em condições limitantes de nitrogênio tem por base algumas evidências já conhecidas. A porta de entrada do nitrogênio no metabolismo do carbono é o íon glutamato, que é formado por aminação redutiva do  $\alpha$ -cetoglutarato. Existem dois mecanismos bioquímicos pelo quais isso pode ocorrer. Em condições de abundância de  $\text{NH}_4^+$ , essa reação acontece em um único estágio, catalisado pela glutamato desidrogenase (E.C

---

<sup>3</sup> Matsufuji, M.; Nakata, K.; Yoshimoto, A. High production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. **Biotechnol. Lett.**, v. 19, p. 1213-1215, 1997.

1.4.1.4) para formar o glutamato. O outro mecanismo é um processo de dois estágios, onde a glutamina é o intermediário, ocorrendo em condições onde a concentração de  $\text{NH}_4^+$  é baixa. Esse segundo mecanismo leva as células a usarem energia livre a partir da hidrólise da adenosina trifosfato (ATP), onde a glutamina sintetase (E.C. 6.3.1.2) assimila a amônia. Com base nesse metabolismo clássico, pode-se sustentar uma possível associação da síntese de ramnolipídeos por condições limitantes de nitrogênio. Dessa forma, supondo uma escassez de  $\text{NH}_4^+$ , onde a via glutamina sintetase é ativada, promoveria conseqüentemente, uma demanda adicional de ATP, e a célula se veria obrigada a reorientar seu metabolismo de forma a atender à síntese de ATP, o que equivaleria a aumentar o consumo de fontes de carbono e abrir mão de reservas energéticas (polihidroxialcanoatos) (Santos, 2003).

Tendo em vista o exposto, a relação carbono/nitrogênio (C/N) torna-se uma variável importante na otimização do meio de cultivo para produção de ramnolipídeos, afetando a produção de biomassa e de ramnolipídeos podendo variar bastante em função dos pares de fontes de carbono e nitrogênio utilizados (Santos, 2003). Máximos de produção de ramnolipídeos foram observados com o uso de razões de C/N entre 16:1 e 18:1 (Desai e Banat, 1997), enquanto Haba et al. (2000) obtiveram uma maior produção de ramnolipídeos com a relação C/N 8:0 com óleos de fritura como fonte de carbono e  $\text{NaNO}_3$  como fonte de nitrogênio. Por outro lado, Arino et al. (1996) obtiveram uma maior produção de ramnolipídeos utilizando relação C/N de 67:1 (2,1 g/L) com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e de 16:1 (5,8 g/L) com  $\text{NaNO}_3$  e glicerol (30 g/L) e Santa Anna et al., 2002 reportou maior produção de ramnolipídeos com uma relação de C/N 60:1 (3,16 g/L), utilizando  $\text{NaNO}_3$  e o glicerol. Neste trabalho, a maior produção de ramnolipídeos (3,9 g/L) foi encontrada utilizando-se a relação C/N 55, com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio e fonte de carbono o glicerol (30 g/L).

A limitação de cátions multivalentes também está associada ao aumento da produção de ramnolipídeos (Soberón-Chávez, et al., 2005). A limitação de alguns cátions ( $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e elementos traços) resultou em aumento da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* DSM 2659 (Guerra-Santos et al., 1986), o que também ocorreu quando se limitou o íon  $\text{Fe}^{2+}$  (Soberón-Chávez, et al., 2005; Nitschke et al., 2005). A limitação de fosfato na produção de ramnolipídeos, resultou

em aumento de 4 a 5 vezes na produtividade específica em comparação com a limitação de nitrogênio (Chayabutra et al., 2001).

Outros parâmetros como temperatura, pH, agitação, disponibilidade de oxigênio também são fundamentais na produção de ramnolipídeos.

Guerra-Santos et al. (1984) observaram um elevado aumento de ramnolipídeos com a cepa *Pseudomonas sp.* quando valores de pH entre 6 e 6,5 foram utilizados, e um decréscimo acentuado com valores acima de pH 7,0. Um aumento significativo na produção de ramnolipídeos foi observado em culturas de *P. aeruginosa* UG2 quando foi usado valores de pH próximos da neutralidade.

Valores de temperatura entre 28 e 37° C são apontados na literatura como parâmetros que podem variar de acordo com a cepa de *P. aeruginosa* (Déziel et al., 2000, Mata-Sandoval et al., 1999; Desai e Banat, 1997; Arino et al., 1996; Robert et al., 1989).

**Tabela 4.** Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* em Fermentação Submersa

Cepa	Fonte carbono	Ramnolipídec	Referências
<i>P. aeruginosa</i> DSM	glucose	2,25 g/L	Reiling et al. 1986
<i>P. aeruginosa</i> <sup>a</sup>	glicerol	3,16 g/L	Santa Anna et al. 2002
<i>P. aeruginosa</i> LBI	óleo de nozes	9,90 g/L	Costa et al. 2006
<i>P. aeruginosa</i> LBI	soapstock <sup>c</sup>	12,0 g/L	Benincasa et al. 2002
<i>P. aeruginosa</i> LBI	soapstock	11,7 g/L	Nitschke et al. 2005
<i>P. aeruginosa</i> <sup>b</sup>	óleo de peixe	22,7 g/L	Lee et al. 2004
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3924	etanol	32,0 g/L	Matsufuji et al. 1997
<i>P. aeruginosa</i> UI 29791	óleo de milho	46,0 g/L	Linhardt et al. 1987
<i>P. aeruginosa</i> DSM7108	óleo de soja	78,0 g/L	Lang e Wullbrandt, 1999
<i>P. aeruginosa</i> DSM7107	óleo de soja	112,0 g/L	Lang e Wullbrandt, 1999

<sup>a</sup> *P. aeruginosa* isolada de água de lavagem de poços de petróleo do Nordeste do Brasil.

<sup>b</sup> *P. aeruginosa* isolada de água do mar da Coréia.

<sup>c</sup> subproduto obtido a partir do resíduo do refino do óleo de soja bruto.

## 2.6. Aplicações dos Ramnolipídeos

A Tabela 5 apresenta as diversas possibilidades de aplicação dos biosurfactantes.

**Tabela 5.** Biosurfactantes e ramos industriais de aplicação

<b>RAMO</b>	<b>APLICAÇÃO</b>	<b>FUNÇÃO DO BIOSURFACTANTE</b>
<b>INDUSTRIAL</b>		
<b>Petróleo</b>	Recuperação Melhorada de Petróleo (MEOR) Desemulsificante	Redução da viscosidade de óleos, recuperação de óleo residual  Desemulsificação de emulsões, solubilização, redução da viscosidade, agente umectante
<b>Ambiental</b>	Biorremediação  Remediação <i>Soil washing</i> , <i>Soil flushing</i>	Emulsificação de hidrocarbonetos, agente seqüestrante de metais  Emulsificação por aderência ao hidrocarboneto, dispersante, agente de espuma, detergente
<b>Biológico</b>	Ingrediente funcional  Microbiologia  Farmacêutica	Interação com lipídeos, proteínas e carboidratos, agente protetor.  Comportamento fisiológico como mobilidade celular, comunicação celular  Antibacteriana, antifúngica, antiviral, agentes penetrantes e umectantes
<b>Agricultura</b>	Biocontrole	Facilita mecanismos associados ao microrganismo como parasitismo, competição, resistência sistêmica induzida e hipovirulência  Emulsificantes, agentes de espuma, solubilizadores, umectantes, agentes de limpeza
<b>Cosmética</b>		

Fonte: Adaptada Singh et al. (2007)

Em relação às aplicações industriais, uma que se destaca é a recuperação melhorada do petróleo (microbial enhanced oil recovery - MEOR). A MEOR consiste em uma tecnologia que utiliza microrganismos ou produtos de seu metabolismo para a recuperação de óleo residual. Os microrganismos produzem biosurfactantes que reduzem a tensão superficial óleo-rocha, diminuindo as forças capilares que impedem a movimentação do óleo através dos poros da rocha, possibilitando um aumento da recuperação do óleo. No mesmo processo, os biosurfactantes também auxiliam na emulsificação e na quebra dos filmes de óleo das rochas (Singh et al., 2007).

A aplicação de biosurfactantes em processos MEOR envolve duas técnicas: a) *in situ*, onde microrganismos produtores de biosurfactantes são introduzidos no reservatório, com a adição de nutrientes adequados ao seu crescimento, e b) *extra situ*, onde o biosurfactante é produzido na superfície, isolado, purificado e injetado no reservatório. Das duas técnicas, a que apresenta menos problemas de aplicação, embora seja mais cara, é a *extra situ*, uma vez que na técnica *in situ* o ambiente de crescimento do microrganismo é considerado microbiologicamente agressivo, ou seja, altas pressões e temperaturas, valores de pH extremos, força iônica elevada e competição com microrganismos endógenos, requerimento e disponibilidade de substratos e condições anaeróbicas (Banat et al., 2000).

Um exemplo da eficiência de diferentes biosurfactantes utilizados em MEOR, em testes de laboratório, está apresentado na Tabela 6. Verificou-se a maior remoção de óleo (cerca de 18% a mais) para o processo com biosurfactantes em um menor tempo de ação dos compostos em relação ao controle (média de 38 h a menos), onde foi adicionada apenas água.

**Tabela 6.** Efeito da adição de biosurfactantes na recuperação de óleo (MEOR) em escala laboratorial

Biosurfactante	Tempo (horas)	Remoção de óleo (%)
Controle	114	81
Soforolipídeo	75	97
Ramnolipídeo	77	94
Trealose 6-6'dimicolato	71	93
Celbiose	79	99

Fonte: Muller-Hurting et al. (1993),

Os ramnolipídeos também podem ser utilizados no processo de biorremediação. A biorremediação caracteriza-se como uma tecnologia limpa e de baixo custo, que permite a recuperação de locais contaminados pela estimulação do crescimento de microrganismos nativos, que possuem capacidade de degradar o óleo, convertendo substâncias complexas em moléculas mais simples ou voláteis, promovendo a degradação dos contaminantes adsorvidos ao solo (Ang et al., 2005).

Na biodegração de contaminantes orgânicos, o efeito da adição de ramnolipídeos tem sido vastamente estudado. Shreve et al.<sup>4</sup>, Zhang e Miller<sup>5</sup>, citados por Mulligan, (2005) e relataram que a concentração de 300 mg/L de ramnolipídeos aumentou a degradação do octadecano para 20%, produzindo CO<sub>2</sub> e água (mineralização) comparada a 5% do controle. Maier e Soberón-Chávez (2000) relataram que a adição de ramnolipídeos no meio aquoso melhora a biodegradação dos compostos hexadecano, octadecano, *n*-parafina e fenantreno, e em solos, dos compostos hexadecano, tetradecano, pristina, creosato e outras misturas de hidrocarbonetos.

Rahman et al., (2003) relataram a biorremediação de *n*-alcanos em um lodo de petróleo, contendo 87,4% de óleo e graxas. Dez por cento (10%) deste lodo continha alcanos de cadeia C<sub>8</sub>-C<sub>11</sub> e que foram degradados 100%; enquanto os alcanos de cadeia C<sub>12</sub>-C<sub>21</sub>, C<sub>22</sub>-C<sub>31</sub>, e C<sub>32</sub>-C<sub>40</sub> foram degradados respectivamente,

<sup>4</sup> Shreve, G.S.; Inguva, S.; Gunnan, S. Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular and Marine Biology and Biotechnology**, v.4, p. 331-337, 1995.

<sup>5</sup> Zang, Y.; Miler, R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant. **Applied Envir. Microb**, v. 58, p. 3276-3282, 1992.

83-98%, 80-85% e 57-73% depois de 56 dias com a adição de um consórcio de bactérias, nutrientes e ramnolipídeos.

Na biodegração envolvendo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) Vipulanandan e Ren<sup>6</sup> citados por Mulligan, (2005) compararam a solubilização do naftaleno por um biosurfactante (ramnolipídeo), um surfactante aniônico, (sulfato dodecil de sódio, SDS), e por um surfactante iônico - Triton X-100. Neste trabalho, o biosurfactante aumentou a solubilidade do naftaleno em 30 vezes. Entretanto, a biodegradação do naftaleno (30 mg/L) levou 40 dias na presença do biosurfactante (10 g/L), comparado a 100 h para o Triton X-100 (10 g/L). O naftaleno na presença do SDS não foi biodegradado.

O uso de biosurfactantes na biodegradação de pesticidas vem sendo objeto de investigação. Mata-Sandoval et al. (2001) relataram a biodegradação de três pesticidas em culturas líquidas e solos "soil slurries" por ramnolipídeos e Triton X-100. A biodegração do pesticida Trifluralin melhorou tanto na presença do biosurfactante quanto na do surfactante químico; entretanto, para o pesticida Atrazina a biodegradação diminuiu. A biodegradação do pesticida Coumafós aumentou com a concentração de ramnolipídeos acima de 3 mM, mas diminuiu quando concentração de Triton X 100 estava acima da CMC. Em "soil slurries", a degradação do Trifluralin diminuiu, tanto usando o biosurfactante quanto o surfactante químico, quando as concentrações aumentaram. Quando a concentração de ramnolipídeos aumentou, as taxas de degradação do Coumafós diminuíram, mas as de remoção aumentaram. A concentração de ramnolipídeo também diminuiu, sugerindo a biodegração do próprio ramnolipídeo.

Além da biodegradação, os ramnolipídeos têm sido objeto de estudo nas tecnologias chamadas de "soil washing" e "soil flushing". Na tecnologia *ex situ washing* os biosurfactantes tiveram um papel muito importante na limpeza do derramamento de óleo causado pelo navio Exxon Valdez, no Golfo do Alasca, em 1989. Outros exemplos empregando esta tecnologia envolvem, além da remoção de óleo de locais contaminados, também a remoção de metais pesados. Banat et al. (2000), investigaram a aplicação de ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* ATCC 9027 na remoção de metais de solos contaminados com cádmio e níquel.

---

<sup>6</sup> Vipulanandan, C.; Ren, X. Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. **Journal of Environmental Engineering**, v.126, p. 629-634, 2000.

Eles reportaram que 92% de  $\text{Cd}^{++}$  foi complexado em solução de 0,5 mM de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ , usando uma solução aquosa de ramnolipídeos (22 mg/g).

Neilson et al. (2003) relataram o potencial de aplicação de ramnolipídeos na remoção de metais de solos contaminados com chumbo. Os autores reportaram que, usando uma solução de 10 mM de ramnolipídeos, cerca de 15% de chumbo foram removidos depois de 10 lavagens.

Mulligan e Eftekhari (2003) utilizaram a tecnologia *in situ soil flushing* na remediação de um solo contaminado com pentaclorofenol (PCF). Eles injetaram 1% de ramnolipídeo na forma de espuma em um solo contaminado com 1.000 mg/kg de PCF e obtiveram a remoção de 60 - 61% de PCF.

Um outro potencial de aplicação dos biosurfactantes é seu uso na agricultura, como agentes antimicrobianos. A ação antimicrobiana dos ramnolipídeos foi estudada por Stanghellini e Miller (1997) em espécies de zoosporos fitopatogênicos tais como *Pythium aphanidermatum* e *Phytophthora capsici*. Em concentrações de 5-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , os ramnolipídeos foram capazes de cessar e lisar a população dessas espécies de zoosporos em apenas 1 min.

Outro tópico de interesse relaciona-se com as atividades biológicas dos ramnolipídeos. Atividades antifúngicas, antibacterianas foram, reportadas por diversas misturas de ramnolipídeos (Benincasa et al., 2004; Haba et al., 2003a; Abalos et al., 2001). Piljac e Piljac (1995) estudaram a atividade biológica dos ramnolipídeos *in vitro* e *in vivo*, testando a aplicação deste biosurfactante como droga no tratamento de doenças auto-imunes tais como Aids, Alzheimer, Parkinson e Psoríase. Os testes realizados com os ramnolipídeos na concentração de 0,1 mg/mL foram capazes de inibir diversas enzimas relacionadas às doenças, como lipoxigenases, acetilcolinesterases,  $\beta$ -galactosidades, carboxipeptidases e tripsina.

### **3. OBJETIVOS**

---

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo geral

O presente trabalho visou estudar a produção e caracterizar molecular e estruturalmente o biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* UFPEDA 614.

#### Objetivos específicos

- i. Comparar, em ensaios preliminares, a produção de biosurfactante por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 e por outras cepas de microrganismos.
- ii. Estudar a produção de biosurfactante por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 por fermentação submersa (FS), determinando os efeitos da relação C/N no meio contendo glicerol como indutor.
- iii. Otimizar a produção por FS no sentido de aumentar a produtividade do biosurfactante, pela verificação dos efeitos dos meios de cultura e das condições de fermentação, utilizando um delineamento fatorial.
- iv. Isolar e caracterizar molecular e estruturalmente o biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* UFPEDA 614

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. INTRODUÇÃO

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no Departamento de Química, nos Laboratórios de Tecnologia Enzimática e Biocatálise e no Laboratório de Química de Carboidratos, Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná.

### 4.2. EQUIPAMENTOS e REAGENTES

A Tabela 7 mostra os principais equipamentos utilizados neste trabalho e a Tabela 8 mostra os reagentes mais importantes.

**Tabela 7.** Descrição dos equipamentos utilizados nesse trabalho

<u>Equipamentos</u>	<u>Marca/ Modelo</u>
- Balança analítica e de precisão	- HR-200, Marte (Brasil)
- Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa Finnigan ITD 800 (ion trap detector)	- Varian 3300 e Varian Saturn 2000R
- Espectrômetro	- UV-240 IPC, Shimadzu
- Evaporador rotatório	- Fisatom -0405 (Brasil)
- Potenciômetro	- 320 pH meter, Cornig
- Espectrômetro de RMN 400 MHz em relação ao núcleo $^1\text{H}$ , e 100.623 MHz em relação ao núcleo de $^{13}\text{C}$ .	- Bruker, Avance DRX 400 de 9,4 Tesla
- Espectrômetro de massa	- triplo quadrupolo Quattro LC, Micromass (Inglaterra)
- Tensiômetro	- K12, Processor Tensiometer, Krüss (Hamburgo, Alemanha)
- Centrífuga	- BR4i, Jouan (França)
- Agitador orbital,	- TE-421, Tecnal
- Autoclave	- Bio Enge

**Tabela 8.** Principais reagentes utilizados nesse trabalho

<b><u>Reagentes</u></b>	<b><u>Fornecedor</u></b>
- L-Ramnose, 99% pureza	Sigma-Aldrich
- Orcinol monohydrate	Sigma-Aldrich
- Ácido 3-hidroxicaproico: 98% pureza,	Sigma
- Glicerol PA,	Panreac (USA)
- Óleo de motor 10W-40	Helix Plus, SHell
- methanol, clorofórmio	Vetec
- metaperiodato de sódio	Vetec
- Ácido trifluoracético	Vetec
- Placas de Sílica gel 60 (F <sub>254</sub> 20 x 20, 0,2 mm ) e pó (0,063 – 0,200mm)	Merck
- Borohidreto de sódio	Vetec
- Extrato de levedura	Biobrás
- Triptona	Difco
- meio BDA	Biobrás
- NaCl	Vetec

### 4.3. MICRORGANISMOS

A cepa *P. aeruginosa* UFPEDA 614 foi isolada de campos de petróleo no Nordeste Brasileiro e gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janete Magali, do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Para os ensaios prévios de comparação de produção de biosurfactantes, além de *P. aeruginosa* UFPEDA 614, foram utilizadas as seguintes cepas: *Penicillium corylophilum* IOC 4211, *Aspergillus niger*, *Penicillium aurantiogriseum* IOC 4212, *Burkholderia cepacia* LTEB 11. As cepas *Penicillium corylophilum* IOC 4211, *Aspergillus niger*, *Penicillium aurantiogriseum* IOC 4212, *Burkholderia cepacia* LTEB 11 pertencem ao Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB).

#### 4.4. MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Para a manutenção, realizada mensalmente, a cepa de *P. aeruginosa* UFPEDA 614 foi inoculada em 50 mL do meio líquido Luria-Bertani (LB) [1 % (m/v) triptona, 1 % (m/v) NaCl e 0,5 % (m/v) extrato de levedura] e cultivada a 30 °C, 200 rpm, durante 12 h ou tempo necessário para se atingir  $A_{600}$  igual a 0,8, valor este equivalente a  $10^8$  células/mL. Deste meio foi retirado 1 mL e adicionado a 1mL de glicerol 40% (v/v), previamente autoclavado. A cepa foi adicionada de glicerol (40%, v/v) então armazenada sob refrigeração a -18°C.

As demais cepas bacterianas foram mantidas da mesma maneira.

As cepas fúngicas foram cultivadas em meio sólido BDA (batata-dextrose ágar) [4% (m/v) de BDA] em placas de Petri, em estufa a 29 °C durante 7 dias, ou até a esporulação dos microrganismos. Após este período, as placas contendo os cultivos foram armazenadas a 4 °C .

#### 4.5. ENSAIOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 E POR OUTRAS CEPAS DE MICRORGANISMOS.

Estes ensaios seguiram dois procedimentos que envolveram a cultura dos microrganismos em FS: (1) a medida da tensão superficial dos sobrenadantes de cultura (item 4.8.3) e (2) a verificação do espalhamento da gota de óleo pelos sobrenadantes de cultura (item 4.8.2)

##### 4.5.1 Meios e Condições de Cultivo

As cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio LB, a 30 °C e 150 rpm durante 12 h ou tempo necessário para se atingir  $A_{600}$  igual a 0,8-1,0, valor este equivalente a  $10^8$  células/mL. Os cultivos com as cepas fúngicas foram iniciados pela adição de 1 mL de suspensão de esporos ( $10^8$  esp/mL) aos frascos de fermentação.

Um (1) mL de cada cultura (bacteriana ou fúngica) foi inoculado em Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL do meio de cultivo composto de: 3% (m/v) glicose, 3% (m/v) NaCl, 0,1% (m/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,025% (m/v)  $\text{MgSO}_4$ , 1% (m/v) extrato de levedura e 1% solução de sais ( $\text{MnSO}_4$  – 3 g/L,  $\text{FeSO}_4$  – 0,10 g/L,  $\text{CaCl}_2$  – 0,10 g/L,  $\text{CoCl}_2$  – 0,10 g/L,  $\text{ZnSO}_4$  – 0,10 g/L,  $\text{CuSO}_4$  – 0,01 g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,01 g/L,  $\text{KMnO}_4$  – 0,01 g/L) em tampão fosfato 0,2 mol/L e pH 7,0.

Os cultivos foram incubados a 30°C por 96 h, e em seguida submetidos à análise da tensão superficial (item 4.8.3) e ao teste do colapso da gota (4.8.2)

Para a produção de biosurfactantes foi utilizado o meio salino mineral constituído de: (g/L) 3,0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 7,0  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , glicerol (3%, v/v) como indutor e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em tampão fosfato 0,2 mol/L pH 7,0 (Santa Anna et. al., 2001). O meio de cultivo foi autoclavado a 120 °C/15 min/1 atm.

#### **4.6. ESTUDOS DA PRODUÇÃO DO BIOSURFACTANTE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FS)**

Após os ensaios preliminares, foram realizados os estudos de produção do biosurfactante por fermentação submersa com a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. O pré-inóculo foi realizado em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio Luria- Bertani (LB), a 30 °C e 200 rpm durante o tempo necessário para se atingir  $A_{600}$  igual a 0,8 – 1,0, valor este equivalente a  $10^8$  células/mL. Dois por cento (2%) desta cultura foram então inoculados em Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio salino mineral estéril (item 4.5.1).

##### **4.6.1. Efeito da Relação Carbono/Nitrogênio (C/N) na Produção do Biosurfactante**

A produção de ramnolipídeos foi investigada usando as relações carbono/nitrogênio (C/N) de 10, 20, 40 e 55, em frascos de Erlenmeyers de 1 L com o inóculo inicial padronizado em 2% (v/v) e meio salino mineral (200 mL), como mencionado previamente (item 4.5.1). As culturas foram mantidas à temperatura de 30° C, em agitador orbital a 200 rpm, durante 198 e 216 h. A fonte de carbono usada

foi o glicerol (3%, v/v). Sulfato de amônio foi utilizado como fonte de nitrogênio nas concentrações de 5,53; 2,76; 1,38 e 1,0 g/L, equivalentes às relações C/N de 10, 20, 40 e 55, respectivamente. Ao final dos cultivos, o sobrenadante das culturas foi separado das células por centrifugação (12.500 x g) por 30 min e submetido à dosagem de ramnose e determinação da tensão superficial e interfacial (item 4.8.3). O material sólido residual foi utilizado para a determinação de biomassa (item 4.8.1).

#### 4.6.2. Otimização da Produção do Biosurfactante por Delineamento Fatorial

Para investigar o efeito de três variáveis independentes sobre a produção de biosurfactantes, foi empregado um delineamento fatorial  $3^3$  incompleto com três repetições no ponto central, totalizando 15 ensaios (Box e Behnken, 1960).

As variáveis independentes analisadas nos três níveis de variação foram (g/L): a concentração de glicerol ( $X_1$ ), a concentração de  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)$  ( $X_2$ ) e a concentração de  $\text{FeSO}_4$  ( $X_3$ ). Os níveis e os valores correspondentes aos valores reais e codificados, aparecem na Tabela 9. A variável resposta, ou dependente investigada neste estudo foi a produção de biosurfactantes expressos em ramnose (g/L). As condições de cultivo foram realizadas em agitador orbital, sob agitação de 200 rpm e acompanhados durante 168 h.

**Tabela 9.** Valores reais e codificados para o Delineamento fatorial de Box-Behnken  $3^3$  incompleto

Variáveis	Níveis		
	(- 1)	(0)	(+1)
$X_1$ - Glicerol (g/L)	30	60	90
$X_2$ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	1	5	9
$X_3$ - $\text{FeSO}_4$ (g/L)	0	0,007	0,014

Uma equação polinomial quadrática foi escolhida para o presente estudo, em razão de ser a equação mais simples e que permite o emprego de técnicas gerais de otimização (Krieger, 1988). A forma geral da equação quadrática é:

$$Y \equiv \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \varepsilon \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

Y é a variável dependente;

$x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são os níveis codificados das variáveis independentes;

$\beta$ 's são os coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados, e

$\varepsilon$  é o resíduo que mede o erro experimental, apresentando uma distribuição normal, com média zero e variância igual a  $\sigma^2$ .

#### **4.6.2.1. Análise Estatística**

O modelo matemático foi testado para a falta de ajuste, pelo teste F a partir da análise de variância (ANOVA) usando o programa <sup>®</sup> STATISTICA (data analysis software system), version 5.0.

### **4.7. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO BIOSURFACTANTE**

#### **4.7.1. Extração**

Após sete dias de fermentação, o meio de cultivo foi centrifugado para remoção das células (12.500 x g) por 30 min e o sobrenadante foi acidificado, ajustando-se o pH até 2 com HCl concentrado, e mantido a 4 °C sob agitação por 12 h, para precipitar o biosurfactante. O precipitado foi separado por centrifugação (12.500 x g) por 20 min, e dissolvido em 0,4 mol/L HCl e submetido à extração por duas vezes com CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1). A fase orgânica foi evaporada numa temperatura inferior a 40 °C em evaporador rotatório sob pressão reduzida, obtendo-se a fração residual, aqui denominada extrato bruto (EB). Esta fração foi submetida aos procedimentos de purificação, conforme descrito a seguir.

## **4.7.2. Purificação por Métodos Cromatográficos**

### **4.7.2.1. Cromatografia em Coluna**

A coluna cromatográfica (30 cm x 2 cm) foi empacotada com sílica gel 60 (30 g), com as partículas de tamanho entre 0,063-0,2 mm. As amostras foram aplicadas e eluídas, inicialmente com  $\text{CHCl}_3$  e então com  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (9:1 v/v). Frações de 10 mL foram coletadas. A eluição das frações contendo o biosurfactante foi acompanhada por cromatografia em camada delgada.

### **4.7.2.2. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa**

As frações eluídas da coluna de sílica gel foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a 40 °C e submetidas à CCD preparativa, que foi realizada em placas de vidro (20 x 20 cm) cobertas com sílica gel 60, utilizando como sistema de eluente:  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH}$  (65:15:2). A visualização das bandas foi feita com revelador específico para carboidratos e glicolípídeos,  $\text{orcinol}:\text{H}_2\text{SO}_4:\text{MeOH}$  (250:100:2,5) a 100 °C por 5 min (Skispiski, 1975). Em seguida, procedeu-se a raspagem das bandas visualizadas.

## **4.8. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **4.8.1. Determinação da Biomassa**

Ao final dos cultivos, as amostras foram centrifugadas (12.500 x g) durante 30 min para remover as células. O centrifugado foi suspenso em água destilada e colocado em pesa-filtro em estufa para secagem a 80 °C por 24 h, até peso constante. A biomassa seca foi expressa em peso seco (g/L).

#### **4.8.2. Teste Colapso da Gota**

O teste qualitativo do colapso da gota foi realizado, com pequenas modificações. Tampas de microplacas com 96 poços, foram untadas com 2  $\mu\text{L}$  de óleo de motor 10 W-40 e deixadas em repouso por 24 h. Em seguida, 5  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes das culturas foram colocados em cada um dos poços rasos e o espalhamento das gotas foi avaliado após 2 min. O resultado foi considerado positivo quando se percebeu visualmente o espalhamento da gota (Youssef et al., 2004).

#### **4.8.3. Determinação da Tensão Superficial e da Tensão Interfacial**

A medida da tensão superficial foi realizada nos sobrenadantes de cultura utilizando-se o tensiômetro Krüss. As análises foram feitas pelo método do anel, utilizando um anel de platina denominado anel de Du Nouy. Neste método, a amostra é colocada em um recipiente do aparelho, com o anel inicialmente submerso. Uma força adicional é exercida sobre o anel no momento no qual a lâmina do líquido vai se romper, é então determinada a tensão superficial (Krüss, 1994).

As condições de análise padronizadas para todos os ensaios foram: volume médio da amostra de 40 mL e temperatura ambiente. O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises medindo-se a tensão superficial da água destilada.

A medida da tensão interfacial foi realizada utilizando o método da placa de platina, denominada placa de Wilhelmy. As medidas foram realizadas nos sobrenadantes de cultura contra o querosene como meio imiscível. O aparelho foi zerado com o querosene, que constituiu a fase leve da mistura, e a seguir a amostra (fase pesada) é colocada no recipiente do aparelho, a placa é inserida, e somente depois o querosene é adicionado delicadamente com a ajuda de pipeta automática, sobre a amostra. Durante a medida de tensão interfacial, a placa sobe da fase pesada e a leve, e então determina a tensão interfacial entre elas (Krüss, 1994).

As condições de análise padronizadas para todos os ensaios foram: volume médio da amostra de 40 mL, volume médio da fase leve de 10 mL e temperatura ambiente.

#### 4.8.4. Determinação da Concentração Micelar Crítica – CMC

A CMC foi calculada diluindo o meio de cultura isento de células (após 7 dias de cultivo) com igual volume de água destilada, segundo técnica descrita por Sheppard e Mulligan (1987). Após feitas tais diluições, mediu-se a tensão superficial de cada uma delas e construiu-se um gráfico da tensão superficial contra diferentes concentrações de açúcares totais, expressas em ramnose, onde a CMC corresponde ao ponto central de inflexão da curva. As medidas de tensão superficial foram determinadas até que os valores obtidos se aproximassem da tensão superficial da água destilada.

#### 4.8.5. Medida do Índice de Emulsificação (E %)

O índice de emulsificação (*E* %) foi realizado segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987). Em tubos de ensaio foram distribuídos 6 mL de diferentes hidrocarbonetos (querosene, tolueno, gasolina e diesel) adicionando-se 4 mL do sobrenadante de cultura. Cada tubo foi agitado em vórtex máximo por 2 min. O índice (*E* %) foi determinado de acordo com a equação 2. As medidas foram realizadas após 24 h e após 30 dias.

$$E\% = \frac{\text{altura da camada emulsionada (cm)}}{\text{altura total do líquido (cm)}} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

onde *E* (%) = índice de emulsificação

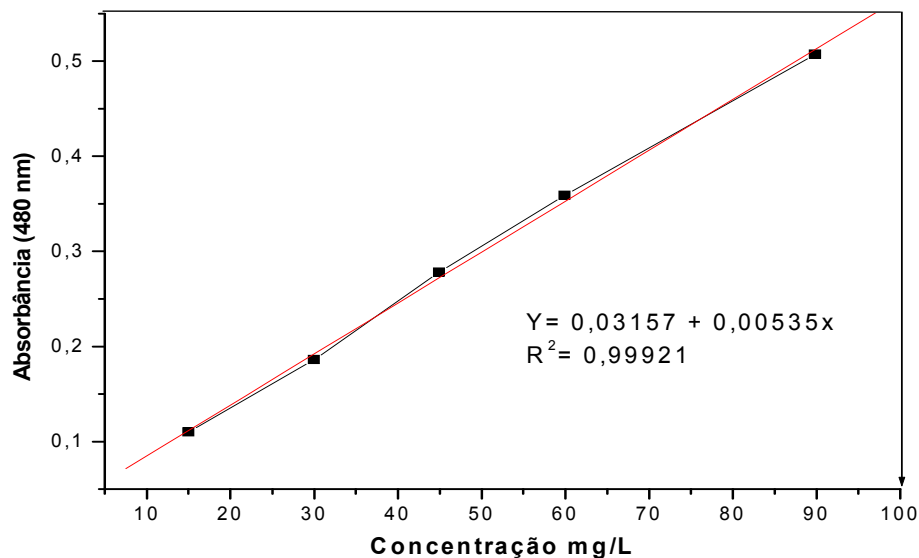
#### 4.8.6. Dosagem de Açúcares pelo Método do Fenol-Sulfúrico

A quantificação indireta de ramnolipídeos foi realizada pela medida de açúcares totais pelo método de Dubois et al (1956).

A metodologia consistiu na adição 0,5 mL do caldo livre de células em tubo de vidro de 20 mL, seguido da adição de 0,5 mL de solução de fenol 5% (m/v), mais 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex e deixada em repouso por 15 min. Após esse período, fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 480 nm. A medida foi lida contra a água destilada (branco reacional).

Procedimento:

A curva de ramnose foi construída utilizando-se uma solução estoque de ramnose padrão com 0,936 mg/mL em água destilada. A partir desta solução foram preparadas diluições correspondentes às concentrações de 15, 30, 45, 60 e 90 (mg/L) em balões volumétricos de 10 mL. A seguir, 1 mL de cada diluição foi adicionado em tubos e a dosagem de açúcares totais por ramnose foi realizada conforme descrita anteriormente. A Figura 4 ilustra a curva padrão de ramnose (mg/L) x absorvância.



**Figura 4.** Curva padrão de açúcares totais por ramnose (mg/L) x absorvância a 480nm, construída utilizando o método de Dubois et al. (1956).

#### 4.8.7. Quantificação de Glicerol

O teor de glicerol foi determinado pelo método químico de Soloni-Modificado (Moura et al.,1998). O fundamento do método baseia-se no seguinte princípio: o glicerol é oxidado a formaldeído, pelo metaperiodato de sódio. O formaldeído resultante reage com acetilacetona, em presença de amônia formando um complexo de cor amarela (3,5-diacetil-1,4 diidrolutidina), que é medido fotometricamente a 410 nm (Figura 5)

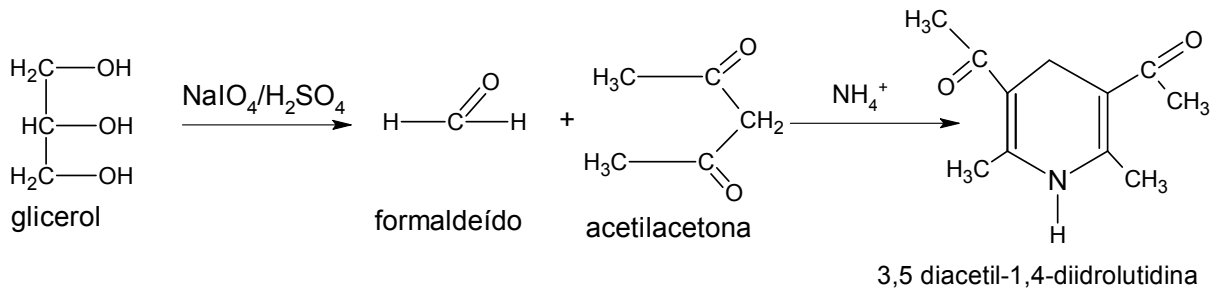


Figura 5. Reação química do glicerol com formaldeído formando o complexo colorimétrico 3,5-1,4-diidrolutidina (410nm), pelo método Soloni-Modificado (Moura et al., 1998).

Procedimento:

A partir de uma solução padrão de glicerol (27,3 mg diluída em 100 mL de água destilada) foram retiradas amostras de 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{L}$ . A estes volumes foi adicionado água destilada de modo a obter 125  $\mu\text{L}$  no tubo de ensaio, seguido da adição de 0,125 mL de metaperiodato de sódio-0,35 M, e 1,25 mL de uma solução contendo acetilacetona- $\text{NH}_4\text{OAC}$ - $\text{NaAsO}_2$ - $\text{H}_2\text{O}$ . A mistura foi agitada em vórtex e incubada a 56 °C durante 10 min, resultando em um complexo amarelo que absorve em 410 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão de glicerol (Figura 6).

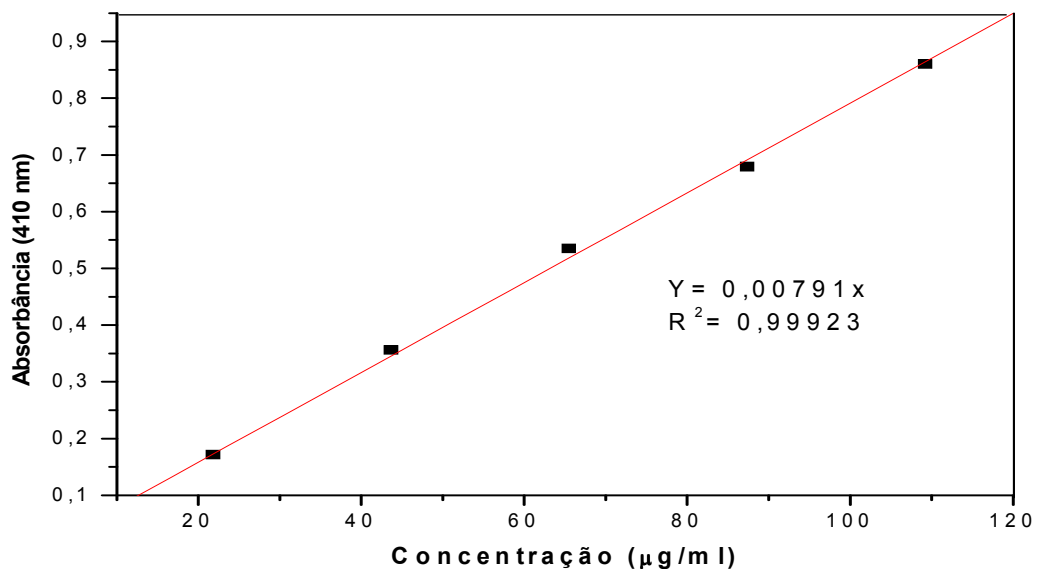


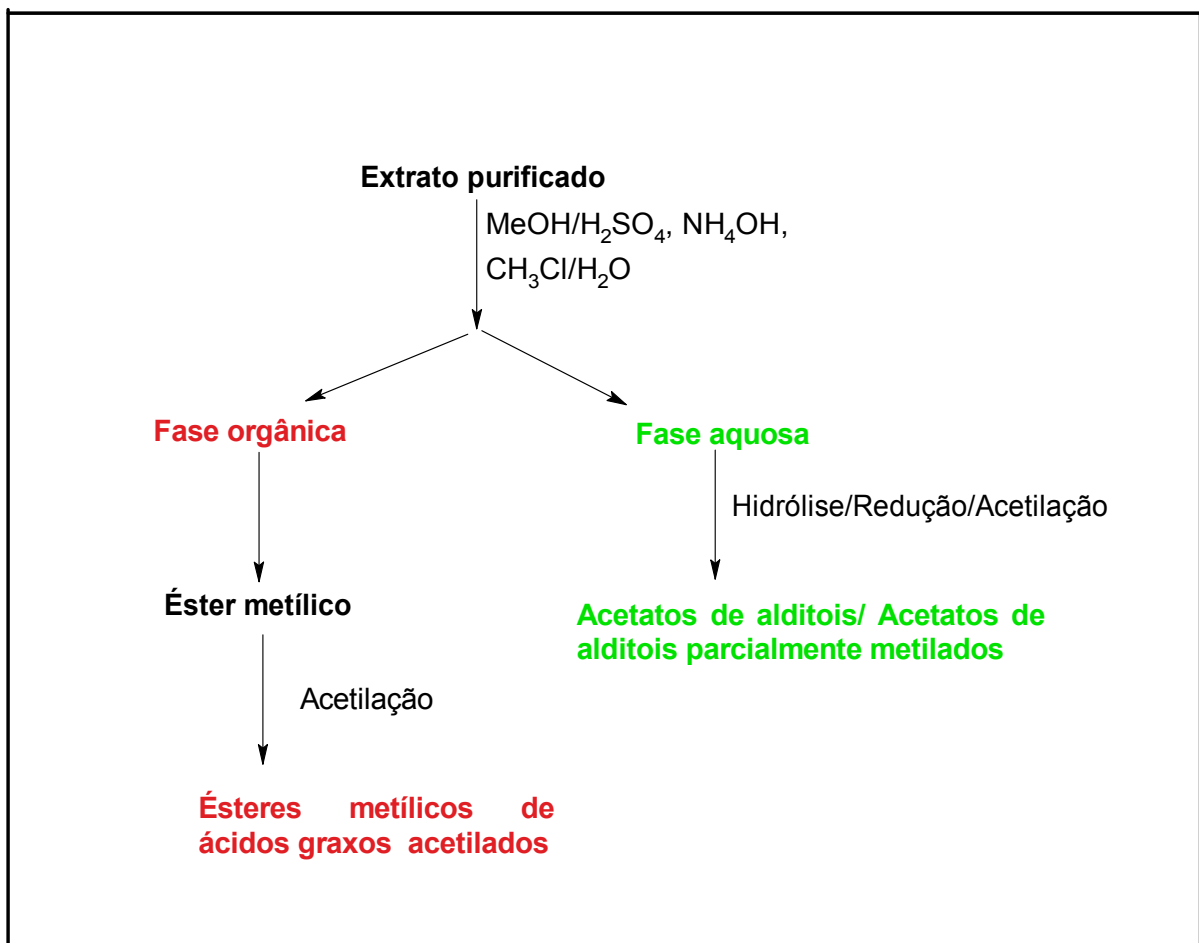
Figura 6. Curva-padrão de glicerol construída utilizando-se o método colorimétrico-químico Soloni-Modificado.

#### 4.8.8. Cromatografia em Camada Delgada

As análises em CCD foram realizadas em placas de sílica gel 60 - PF<sub>254</sub> utilizando como sistema de eluente: CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH (65:25:2). A visualização das bandas foi feita com a utilização de revelador específico para carboidrato, orcinol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:MeOH a 100 °C por 5 min (Skispiski, 1975). O padrão utilizado foi ramnose.

#### 4.9. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

O extrato purificado obtido da cromatografia em camada delgada preparativa (item 4.7.2.2) foi submetido à hidrólise e analisado segundo o esquema mostrado na Figura 7. As etapas deste procedimento serão descritas nos próximos itens.



**Figura 7.** Esquema geral das análises de ácidos graxos e a composição monossacarídica realizadas no extrato purificado do sobrenadante de cultura de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614.

#### 4.9.1. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM)

Os açúcares e os ácidos graxos foram devidamente convertidos em seus respectivos derivados voláteis (acetatos de alditóis ou acetatos de alditóis parcialmente metilados e ésteres metílicos de ácido graxo acetilados) e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) – (Departamento de Bioquímica da UFPR); cromatógrafo gasoso Varian 3300 acoplado a um espectrômetro de massa Finnigan ITD 800 (íon trap detector). A coluna utilizada na separação dos componentes foi uma coluna capilar preenchida com DB-23 (J & W – 30 m x 0,25 mm). O gás de arraste utilizado foi He (5.0 analítico) a um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial do cromatógrafo foi de 50 °C, sendo aumentada para 215 °C a 40 °C min<sup>-1</sup> e mantida constante nesta temperatura até o final da análise (25 min).

Os cromatogramas obtidos foram analisados no software SATURN (2000R – Varian) e os picos identificados pelos seus respectivos tempos de retenção relativo ( $R_t$ ) comparados com padrões conhecidos e confirmados pelo perfil de fragmentação resultante do impacto de elétrons com energia de 70 eV. A janela de massa utilizada foi de  $m/z$  80-220.

#### 4.9.2. Análise dos Ácidos Graxos

Os ácidos graxos foram analisados por CG-EM na forma de ésteres metílicos de ácidos graxos acetilados (Figura 7). Para tanto, inicialmente alíquotas (1 mg) do extrato purificado obtido pela CCD preparativa (item 4.8.3) foram metanolizados em uma solução de 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em MeOH (v/v) por 12 h à temperatura de 80 °C, sob refluxo. A mistura foi neutralizada com uma solução de NH<sub>4</sub>OH (25%, v/v) e os ésteres metílicos de ácidos graxos hidroxilados resultantes da esterificação foram extraídos através de uma partição entre CHCl<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O. A fase aquosa foi submetida à hidrólise com ácido trifluoracético (TFA) 1 mol/L para determinação da composição monossacarídica. A fase orgânica (CHCl<sub>3</sub>) foi evaporada à temperatura ambiente e em seguida acetilada com anidrido acético-piridina (Ac<sub>2</sub>O-piridina) (1:1 v/v) a 100 °C durante 1 h. Os ésteres metílicos de ácidos graxos acetilados (EMAGA) resultantes foram extraídos com CHCl<sub>3</sub> e lavados com uma solução aquosa de 5% CuSO<sub>4</sub> (m/v).

A fase orgânica contendo os EMAGAs foi solubilizada em acetona para ser analisada por CG-EM, conforme descrito no item 4.9.1.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos acetilados foram identificados pelos seus respectivos valores de  $R_t$  e a janela de massa utilizada foi de  $m/z$  80-220.

#### **4.9.3. Determinação da Composição Monossacarídica**

A composição monossacarídica foi determinada como derivados de acetatos de alditóis (Figura 7) (Jansson et al., 1976). Alíquotas de 1mg das frações obtidas na fase aquosa (item 4.9.2), foram submetidas à hidrólise com ácido trifluoracético (TFA) 1 mol./L a 100 °C durante 8 h. Depois de hidrolisado, o material foi evaporado até a secura e o resíduo reduzido com  $\text{NaBH}_4$  à temperatura ambiente (12 h). Em seguida, o material foi lavado com ácido acético glacial:MeOH (1:200 v/v) seguido de evaporação (3x) para remoção do boro na forma de trimetilborato. O produto foi submetido à acetilação com  $\text{Ac}_2\text{O}$ -piridina (1:1 v/v) a 100 °C durante 1 h. O processo foi interrompido por adição de gelo moído, e o material acetilado foi novamente extraído com  $\text{CHCl}_3$ . A piridina foi removida com 5%  $\text{CuSO}_4$ , que por sua vez, foi removido por meio de lavagens sucessivas das amostras com água destilada. O material resultou em uma mistura de acetatos de alditóis, que foram submetidos à análise por CG-EM e identificados comparando seus respectivos valores de  $R_t$ . A janela de massa utilizada foi de  $m/z$  80-220, conforme item 4.9.1.

### **4.10. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL**

#### **4.10.1 Metilação**

A análise de metilação foi realizada pelo método de Kuhn et al. (1955). Alíquotas (1mg) das frações obtidas pela CCD preparativa foram solubilizadas em MeOH e secas. A essa mistura foram adicionados DMF (300  $\mu\text{L}$ ),  $\text{CH}_3\text{I}$  (700 $\mu\text{L}$ ) e  $\text{Ag}_2\text{O}$  (50 mg), com agitação em vórtex por um período de 12 h a 40 °C. Esta solução foi fracionada com  $\text{CHCl}_3$  (2mL), resultando em glicosídeo parcialmente O-metilado (GPM). A mistura de GPM foi evaporada até secura e o resíduo hidrolisado com

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 mol/L) por 12 h a 100 °C (Sasaki et al., 2005). A solução foi neutralizada com NH<sub>4</sub>OH até pH 7,0 e a mistura contendo os GPM foi reduzida com NaBH<sub>4</sub> (5mg) por 12 h à temperatura ambiente. A solução foi neutralizada com ácido acético glacial:MeOH (1:200 v/v) seguida de evaporação (3x) a 40 °C. O produto foi submetido à acetilação com Ac<sub>2</sub>O-piridina (1:1 v/v) a 100 °C por 1 h, resultando em uma mistura de derivados de acetatos de alditóis parcialmente metilados (AAPMs). Os AAPMs foram extraídos com CHCl<sub>3</sub> e lavados com uma solução 2% (m/v) de CuSO<sub>4</sub>. A fase orgânica contendo os AAPMs foi seca e submetida à análise por CG-EM e identificada comparando seus respectivos valores de R<sub>t</sub>. A janela de massa utilizada foi de *m/z* 80-220.

#### **4.10.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H foram realizados em um espectrômetro Bruker Avance DRX 400 MHz e as amostras das frações obtidas pela CCD preparativa analisadas em tubos de quartzo de 20 cm de comprimento e 5 mm d.i.(diâmetro interno). As amostras purificadas (item 4.7.2.2) tiveram os hidrogênios hidroxílicos trocados por deutério através de repetidas solubilizações com CDCl<sub>3</sub>:MeOD (3:1, v/v) seguidas de evaporação. As amostras foram solubilizadas em CDCl<sub>3</sub> e os espectros obtidos a 30 °C. Os espectros unidimensionais de <sup>1</sup>H foram obtidos em 400 MHz, enquanto os espectros de <sup>13</sup>C obtidos com carbono acoplado em 100.62 MHz.

#### **4.10.3. Espectrometria de Massas – ESI-MS (ELECTROSPRAY-IONISATION-MASS-SPECTROMETRY)**

As amostras das frações obtidas pela CCD preparativa foram analisadas em um espectrômetro de massa tipo triplo quadrupolo Quattro LC. Os espectros foram gerados em modo íon negativo. As amostras purificadas obtidas da CCD preparativa (item 4.7.2.2) foram dissolvidas em CH<sub>3</sub>Cl:MeOH (1:1 v/v), e alíquotas de 0,1 mL foram removidas e diluídas em 1,9 mL de acetonitrila:água (7:3 v/v), nas quais foram introduzidas por difusão direta com uma seringa a um fluxo de 10 µL.min<sup>-1</sup>. As condições para as análises foram diferenciadas, dependendo das frações obtidas na

purificação por CCD preparativa (4.7.2.2), variando entre capilar 2,03 kv, cone de 15 a 27 v e energia de colisão (CID) 18 e 45 v F<sub>2</sub> – capilar 2,03 kv, cone 27 v e energia de colisão (CID) 45 v. Para aquisição dos espectros, utilizou-se uma faixa de massa de *m/z* 50 a 800.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ENSAIOS PRELIMINARES DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES POR DIFERENTES MICRORGANISMOS

Ensaio preliminares de produção de biosurfactantes, feitos com os sobrenadantes das culturas das cepas de *P. corylophilum* IOC 4211, *A. niger*, *P. aurantiogriseum* IOC 4212, *B. cepacia* LTEB11, e *P. aeruginosa* UFPEDA 614, revelaram que *P. aeruginosa* foi a única que causou espalhamento da gota (Figura 8, linhas 4 e 5), evidenciando a produção de um composto com propriedades tensioativas.



**Figura 8.** Seleção de microrganismos produtores de biosurfactantes: método do espalhamento da gota – 1, 2: água deionizada; 4, 5: *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614; 7, 8: meio de cultura sem o inóculo; 10,11: *Burkholderia cepacia* LTEB11.

Simultaneamente, foram feitas as medidas de tensão superficial dos sobrenadantes das culturas de todos os microrganismos, sendo que apenas o sobrenadante produzido por *P. aeruginosa* reduziu a tensão superficial de 55 mN/m para 29,9 mN/m, confirmando os resultados obtidos com o método do espalhamento da gota. Em geral, segundo Rosen <sup>7</sup> e Kosaric <sup>8</sup>, citados por Santos (2001),

<sup>7</sup> Rosen, M.J. The relationship of structure to properties in surfactants. **Journal of the American Oil Chemistry Society**. v.49, p.293-297, 1971

biosurfactantes podem reduzir a tensão superficial da água de 72,0 mN/m para valores entre 25-30 mN/m. Esta redução, entretanto, depende da fonte do composto. No caso de cepas do gênero *Pseudomonas*, produtoras de ramnolipídeos, valores similares a 29,9 mN/m têm sido reportados (Sánchez et al., 2006, Lang e Wullbrandt, 1999; Parra et al., 1989)

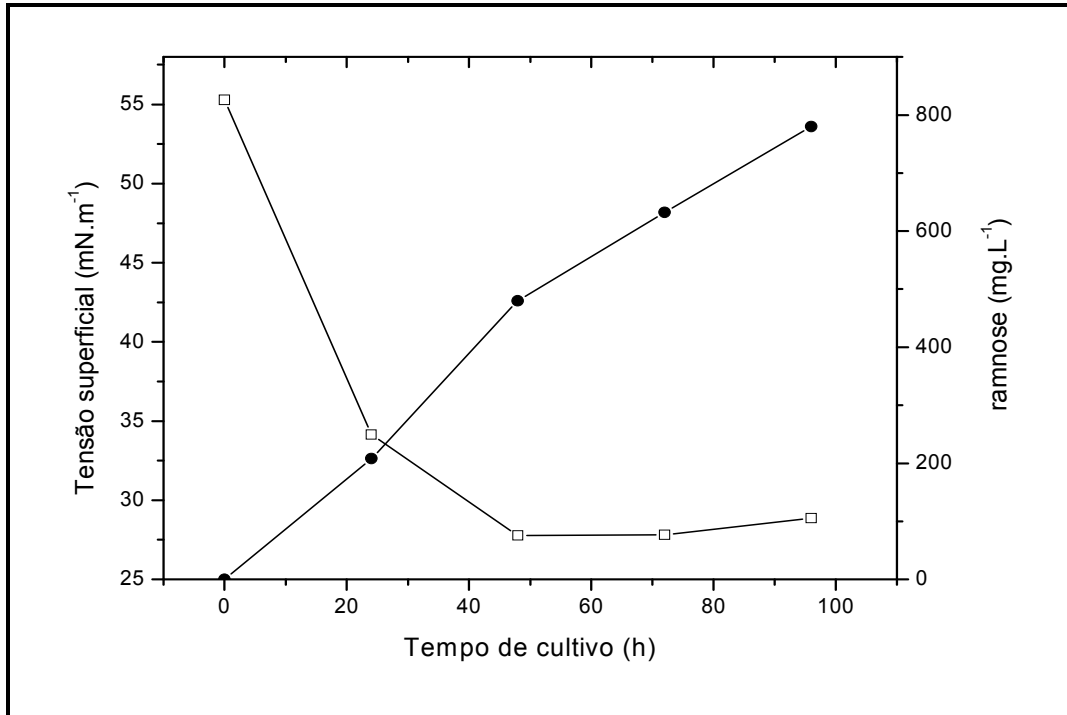
O experimento com *P. aeruginosa* foi então repetido seguindo-se a cinética de produção do tensioativo e de produção de açúcares no meio, expressos em ramnose, considerando que este gênero de bactéria é conhecido pela produção de biosurfactantes do tipo ramnolipídeos (Lang, 2002). Neste cultivo (Figura 9) foi observado o abaixamento de tensão superficial de 55,0 mN/m no tempo inicial, para 27,8 mN/m, após 48 h de cultivo, o que confirmou os resultados obtidos preliminarmente.

O teor de açúcares do meio, determinado pelo método do fenol-sulfúrico e expresso em ramnose, foi de 780 mg/L em 96 h de cultivo. A cromatografia em camada delgada (CCD) do sobrenadante realizado com os padrões de ramnose ( $R_f$  0,15) e galactose ( $R_f$  0,006) e corante específico para açúcares (orcinol), mostrou claramente a presença de duas bandas com valores de  $R_f$  de 0,75 e 0,41 indicando a presença de dois compostos diferentes (Figura 10).

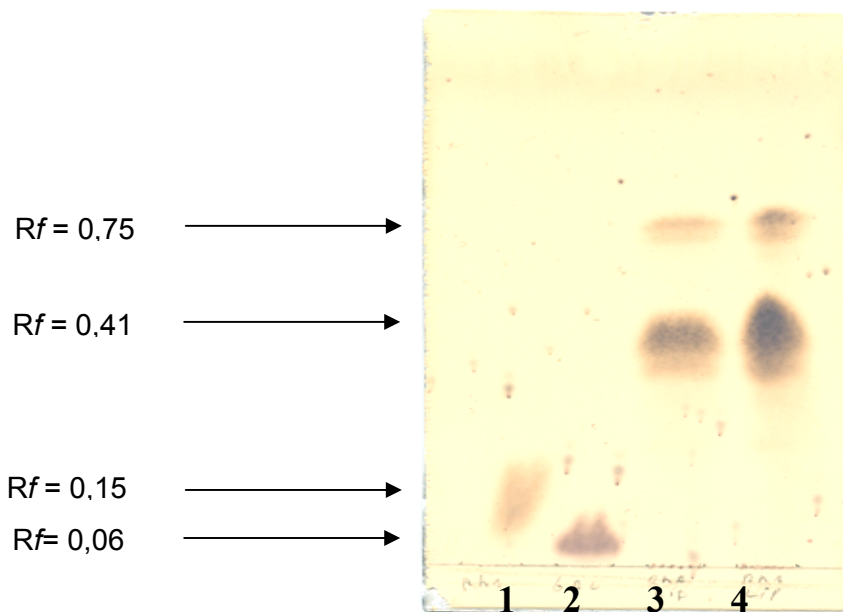
A produção máxima do biosurfactante encontrada neste experimento (0,78 g/L) foi muito baixa se comparada às produções encontradas para cepas de *P. aeruginosa* utilizando meios similares, onde o indutor é o glicerol. Foram então feitos experimentos para aumentar a produção do biosurfactante variando-se a relação C/N do meio, por esta ser considerada uma das variáveis mais determinantes na produção de tensioativos por cepas de *Pseudomonas* (Venkata e Karanth, 1989; Guerra-Santos et al., 1984). A partir deste ponto do trabalho, utilizou-se o teor de ramnose para expressar a quantidade de ramnolipídeos produzida no meio.

---

<sup>8</sup> Kosaric, N. Biosurfactants: Production, properties and applications. **Surfactant Science Series.v.** 48, New York: Naim Kosaric, 1990. 483 p.



**Figura 9.** Variação da tensão superficial e produção de ramnose durante a fermentação de *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Condições do ensaio: Meio de cultura: – 1,0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3,0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7,0 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, e glicerol (3%, v/v) , pH 7,0, 30°C.



**Figura 10.** Cromatografia em camada delgada (CCD) do sobrenadante de cultura (216 h de fermentação) produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. – 1: ramnose; 2: galactose; 3 e 4: sobrenadante de cultura - Sistema de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (65:25:4), desenvolvimento das bandas com orcinol:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Skispiski, 1975).

## 5.2. ESTUDOS DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

### 5.2.1. Efeito da Relação Carbono/Nitrogênio no Meio Contendo Glicerol como Indutor

A produção de ramnolipídeos durante o crescimento foi avaliada em diferentes relações de C/N (10, 20, 40 e 55) (Tabela 10). Os melhores resultados ocorreram na relação C/N 55, (216 h de cultivo, 2,7 g/L biomassa). Neste ponto, o conteúdo de glicerol no meio era de 35% e a concentração de ramnose, de 3,9 g/L. A tensão superficial e a interfacial também foram medidas no final do cultivo (216 h) por se tratarem de duas medidas físicas de suma importância na caracterização de um composto de superfície ativa (biosurfactante). Valores de tensão superficial entre 25 – 30 mN e tensão interfacial próximos a 1 mN/m são os valores reportados pela literatura característicos de biosurfactantes (Lang, 2002). A redução máxima de tensão superficial do meio de cultura (27,34 mN/m) ocorreu em 84 h do cultivo e a tensão interfacial foi de 1,98 mN/m. Os coeficientes de rendimento expressos pela razão entre a quantidade de produto formado em relação ao consumo de substrato ( $Y_{p/s}$ ) e em relação à quantidade de biomassa ( $Y_{p/x}$ ) produzida durante o processo foram de 1,45 e 0,37 g/g respectivamente.

**Tabela 10.** Efeito da relação carbono para nitrogênio (C/N) na produção de biosurfactantes (expressos em ramnose) e biomassa por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Parâmetros do Processo	Relação Carbono/Nitrogênio			
	10	20	40	55
Ramnose (g/L)	1,06	1,42	3,46	3,9
Biomassa (g/L)	2,04	2,62	2,53	2,7
$Y_{p/x}$ (g/g)	0,52	0,54	1,36	1,45
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,12	0,19	0,40	0,37
$Q_p$ (g/L.h)	$5,91 \cdot 10^{-3}$	$7,80 \cdot 10^{-3}$	$1,60 \cdot 10^{-2}$	$1,80 \cdot 10^{-2}$

$Y_{p/x}$  - coeficiente de rendimento em relação à biomassa produzida (concentração máxima de biosurfactante/biomassa),  $Y_{p/s}$  - coeficiente de rendimento do produto formado em relação ao consumo de substrato (biosurfactante/glicerol),  $Q_p$  - produtividade volumétrica - quantidade de produto/L de meio de cultivo.h.

Um aumento de 200 % na produtividade volumétrica foi alcançado quando a relação C/N de 10 ( $Q_p = 5,91 \cdot 10^{-3}$ ) passou para 55 ( $Q_p = 1,80 \cdot 10^{-2}$ ). Outro aspecto fundamental do melhoramento da produtividade volumétrica do biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* está em estabelecer proporções adequadas entre as concentrações de carbono e nitrogênio, ou seja, a relação C/N. Assim, as melhores  $Q_p$  foram obtidas com valores de C/N mais elevadas.

Os resultados aqui obtidos para a relação C/N estão de acordo com os relatados por Lang e Wullbrandt, (1999), Desai e Banat, (1997), Oschsner et al. (1995) e Guerra-Santos et al. (1984), que demonstraram que a produção de ramnolipídeos para outras cepas de *P. aeruginosa* aumenta com a limitação de nitrogênio no meio, sendo a maior produção de biosurfactante obtida quando a relação C/N era máxima.

O teor máximo de ramnolipídeos produzidos neste trabalho foi de 3,9 g/L, que pode ser considerado mais alto do que a maioria dos valores citados na Tabela 11, exceto por Arino et al. (1996) (5,8 g/L), que usou uma fonte de nitrogênio diferente ( $\text{NaNO}_3$ ) e Santos (2003), que produziu o biosurfactante no sistema de batelada alimentada e obteve 4,80 g/L em 240 h.

**Tabela 11.** Produção de ramnolipídeos por diferentes cepas *Pseudomonas aeruginosa* em meios de cultura com glicerol como principal fonte de carbono

Referencias	Fonte		C/N	RL (g/L)	Yp/s (g/g)	Yp/x (g/g)	t (h)	Qp (g/L.h)
	Glicerol (g/L)	Nitrogênio (g/L)						
Este trabalho	30	( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1)	55	3,9	0,37	1,45	216	0,018
Jarvis and Johnson 1949	30	Peptona (40)	ND	2,50	0,08	ND	96	0,026
Hauser and Karnovsky 1954	30	ND	ND	2,00	0,06	ND	120	0,016
Arino et al. 1996	30	NaNO <sub>3</sub> (6,5)	16:1	5,80	0,19	2,07	150	0,038
Santa Anna et al.2001	10	( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1,0)	22:8	1,70	0,17	1.18	240	0.007

**Tabela 11.** Produção de ramnolipídeos por diferentes cepas *Pseudomonas aeruginosa* em meios de cultura com glicerol como principal fonte de carbono (continuação)

Referências	Fonte		C/N	RL (g/L)	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>p/x</sub> (g/g)	t (h)	Q <sub>p</sub> (g/L.h)
	Glicerol (g/L)	Nitrogênio (g/L)						
Santa Anna et al. 2002	30	NaNO <sub>3</sub> (1,0)	60:1	3,16	0,13	0,70	168	0,019
Santos, 2003	(a)	NaNO <sub>3</sub>		4,80	0,12	0,93	240	0,011
Rahman et al. 2002	(a)	ND	ND	1,66	0,27	ND	192	ND
Rahman et al. 2002	(a)	ND	ND	1,77	0,29	ND	192	ND

Condições gerais: frascos agitados, (a) fermentação em batelada alimentada; meio sais minerais ou complexos; 28-37 °C ; pH 6-7,5. ND não determinado. t – tempo de cultivo, RL – ramnolipídeo, Y<sub>p/x</sub> – coeficiente de rendimento em relação à biomassa produzida, Y<sub>p/s</sub> – coeficiente de rendimento do produto formado em relação ao consumo de substrato, Q<sub>p</sub> – produtividade volumétrica. Fonte: Adaptada: Santos, (2003), Lang e Wullbrand (1999).

A Tabela 11 também sugere a existência de uma dependência da relação C/N com a fonte de nitrogênio utilizada e, portanto, da rota metabólica usada para assimilação do nitrogênio oferecido, quando são comparadas as respostas obtidas no estudo de C/N com nitrato e sal de amônio, tendo o glicerol como fonte comum de carbono.

Segundo Soberón-Chávez et al. (2005) a melhor fonte de nitrogênio é o sal de amônio, visto que concentrações altas do íon NH<sub>4</sub><sup>+</sup> reprimem a expressão da glutamina sintetase (EC 6.3.1.2), (ver explicação no item 2.5). Portanto, foi usado o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fonte de nitrogênio, uma vez que em ensaios anteriores, comparando-se a utilização de NaNO<sub>3</sub> com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (não mostrados nesse trabalho), a produção de ramnolipídeos (expressa por ramnose) foi similar. Por isso, deu-se continuidade ao uso de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 5.3. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR DELINEAMENTO FATORIAL

O delineamento fatorial de Box-Behnken é um planejamento experimental utilizado para procedimentos de otimização, baseados em planejamentos fatoriais. O modelo consiste em medir a variabilidade do experimento, na repetição do ponto central e mais um conjunto de pontos fatoriais ancorados no ponto central definindo a região de interesse (Box e Behnken, 1960).

Para otimizar a produção do biosurfactante no meio cuja principal fonte de carbono era o glicerol, foram estudados os efeitos dos parâmetros concentração de glicerol, de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , em ausência ou presença de  $\text{FeSO}_4$  aplicando um delineamento fatorial  $3^3$  incompleto (Box e Behnken, 1960). A Tabela 12 apresenta os resultados experimentais obtidos para a resposta concentração de ramnose.

**Tabela 12.** Resultados experimentais do delineamento fatorial  $3^3$  incompleto com as variáveis codificadas aplicadas no estudo da otimização da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614

Ensaio	Valores Reais			Ramnose (g/L)
	Glicerol (g/L) $X_1$	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L) $X_2$	$\text{FeSO}_4$ (g/L) $X_3$	
1	30 (-1)	1 (-1)	0,007(0)	2,0
2	90 (1)	1 (-1)	0,007(0)	1,74
3	30 (-1)	9 (1)	0,007(0)	0,63
4	90 (1)	9 (1)	0,007(0)	0,42
5	30 (-1)	5 (0)	0 (-1)	0,57
6	90 (1)	5 (0)	0 (-1)	2,93
7	30 (-1)	5 (0)	0,014 (1)	1,35
8	90 (1)	5 (0)	0,014 (1)	0,99
9	60 (0)	1 (-1)	0 (-1)	2,91
10	60 (0)	9 (1)	0 (-1)	2,16
11	60 (0)	1 (-1)	0,014 (1)	2,39
12	60 (0)	9 (1)	0,014 (1)	1,37
13	60 (0)	5 (0)	0,007(0)	1,57
14	60 (0)	5 (0)	0,007(0)	0,91
15	60 (0)	5 (0)	0,007(0)	1,06

Valores codificados entre parêntesis.

As Tabelas 13 e 14 mostram os coeficientes de regressão para a resposta polinomial (Y) e a análise de variância ANOVA para a produção de ramnolipídeos (expressos em teor ramnose), respectivamente.

A Tabela 13 mostra que foram significativos ( $p < 0,05$ ) a média, o termo linear da variável  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , o quadrático de  $\text{FeSO}_4$  e a interação Glicerol ( $X_1$ ) e  $\text{FeSO}_4$  ( $X_3$ ). Os coeficientes de regressão negativos indicam um efeito diminuidor da produção de ramnose para a interação Glicerol ( $X_1$ ) e  $\text{FeSO}_4$  ( $X_3$ ) e para o linear  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

**Tabela 13.** Coeficientes de regressão para a resposta ramnose (g/L) obtidos a partir da Tabela 10

Fatores	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p	Limite de Confiabilidade - 95%	Limite de Confiabilidade + 95%
Média	1,1800	0,2721	4,3365	0,0074	0,4805	1,8794
Glicerol (L)	0,1912	0,1666	1,1477	0,3030	-0,2370	0,6195
Glicerol (Q)	-0,3650	0,2452	-1,4881	0,1968	-0,9954	0,2654
$\text{NH}_4\text{SO}_4$ (L)	-0,5575	0,1666	-3,3457	0,0204	-0,9858	-0,1291
$\text{NH}_4\text{SO}_4$ (Q)	0,3825	0,2452	1,5559	0,1796	-0,2479	1,0129
$\text{FeSO}_4$ (L)	-0,3087	0,1666	-1,8529	0,1230	-0,7370	0,1119
$\text{FeSO}_4$ (Q)	0,6450	0,2452	2,6297	0,0465	0,0145	1,2754
Glicerol x $\text{NH}_4\text{SO}_4$	0,0125	0,2356	0,0530	0,9597	-0,5932	0,6182
Glicerol x $\text{FeSO}_4$	-0,6800	0,2356	-2,885	0,0343	-1,285	-0,0742
$\text{NH}_4\text{SO}_4$ x $\text{FeSO}_4$	-0,0675	0,2356	-0,2864	0,7860	-0,6736	0,5382

(L) termo linear; (Q) termo quadrático, (t) teste de Student, (p) probabilidade.

**Tabela 14 –** Análise de Variância para a resposta ramnose considerando todos os termos do modelo

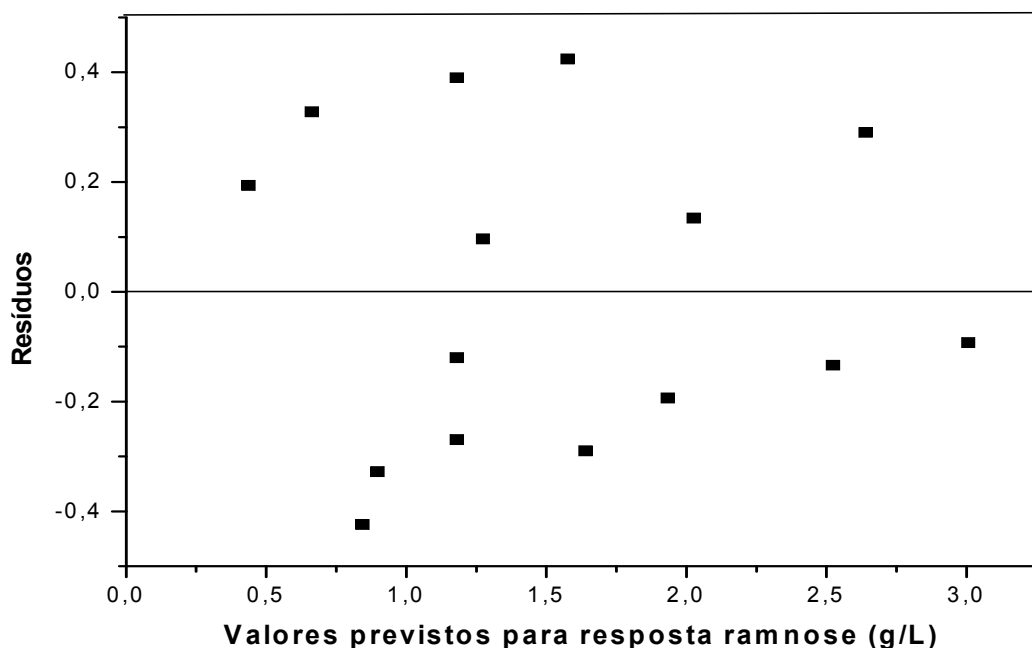
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado
Regressão	8,0753	9	0,8973	4,039 <sup>n.s</sup>	4,77
Resíduos	1,1106	5	0,2221		
Falta de ajuste	0,8712	3	0,2904	2,4262 <sup>n.s</sup>	19,16
Erro puro	0,2394	2	0,1197		
Total	9,1859	14			

% variação explicada ( $R^2$ ) = 87,9094; % máxima de variância explicável = 97,3938.

Os coeficientes do modelo obtido pelo delineamento fatorial estão representados pela equação 3 mostrada abaixo:

$$Y = 1,18 + 0,1912 X_1 - 0,3650 X_1^2 - 0,5575 X_2 + 0,3825 X_2^2 - 0,3087 X_3 + 0,6450 X_3^2 + 0,0125 X_1.X_2 - 0,6800 X_1.X_3 - 0,0675 X_2.X_3 \text{ (Eq. 3)}$$

A Análise de Variância (ANOVA) aplicada aos resultados experimentais para Ramnose (Y), Tabela 14, explica 87,91% da variação de respostas ( $R^2 = 0,8791$ ). Embora a falta de ajuste para a regressão seja não significativa, ( $p = 0,3052$ ), uma das condições exigidas pelo modelo estatístico utilizado na análise de variância é que os erros de ajustamento sejam independentes e normalmente distribuídos. Tais verificações não foram contempladas. Pode-se verificar no gráfico da distribuição dos resíduos (Figura 11) que há pontos muito distantes da equação prevista, sugerindo a ausência de normalidade dos resíduos. Além disto, observam-se valores de resíduos menores para valores maiores da resposta ramnose, indicando que o modelo se adequaria melhor para respostas de ramnose mais elevadas.

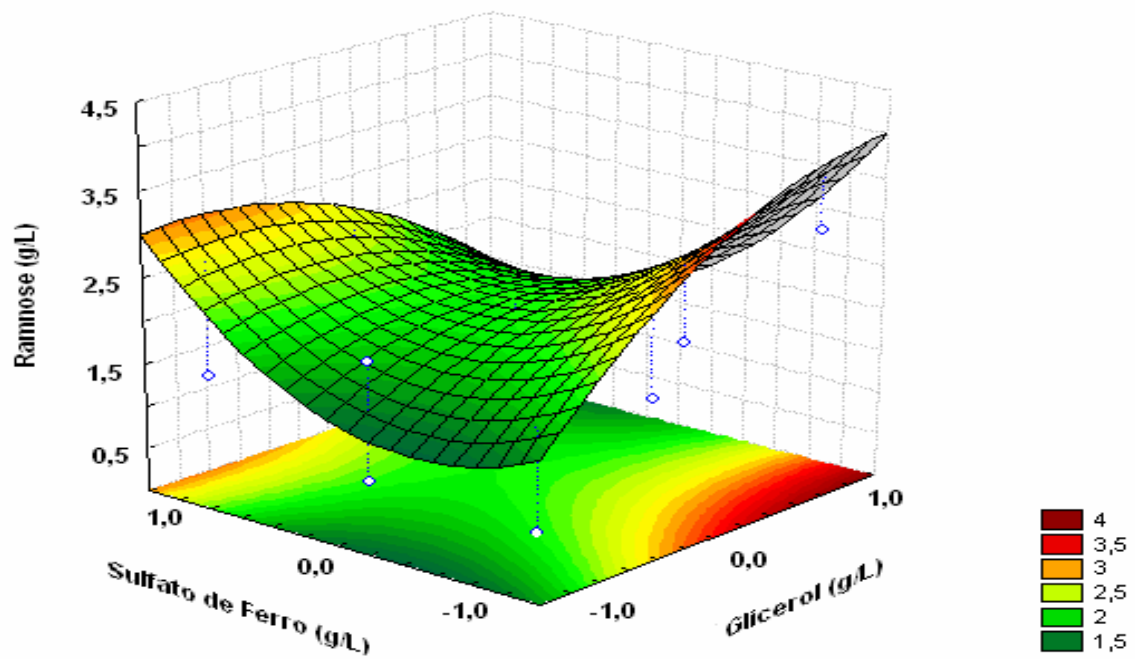


**Figura 11.** Distribuição dos resíduos fornecidos pelo modelo quadrático (Equação 3)

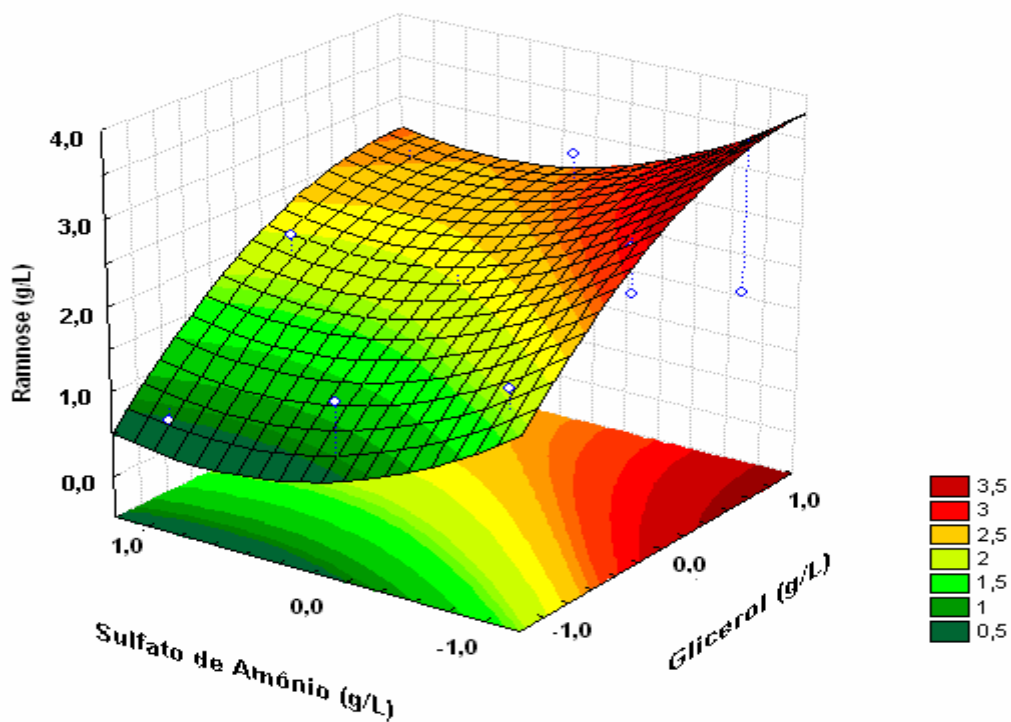
Embora este modelo não possa ser aplicado integralmente, é possível obter-se algumas conclusões deste conjunto de experimentos, que poderão auxiliar na continuação de estudos de otimização futuros. Com esta finalidade apresentam-se as Figuras 12 e 13, que mostram as tendências previstas pelo modelo matemático.

A variável que mais influenciou na resposta ramnose ( $Y$ ) foi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , indicando que a resposta máxima seria obtida quando o teor deste componente fosse mínimo. A limitação de nitrogênio no meio desempenha um importante papel na produção do biosurfactante, conforme já referido anteriormente, somente quando ocorre o esgotamento da fonte de nitrogênio há formação de biosurfactante (Ochsner et al., 1995).

A outra variável que influenciou na resposta ( $Y$ ) foi a interação entre as variáveis Glicerol e  $(\text{FeSO}_4)$ . Embora a fonte de carbono seja essencial na síntese de biosurfactante, a variável ( $X_1$ ) Glicerol, isoladamente parece não influenciar a resposta ramnose ( $Y$ ) nos níveis estudados. Provavelmente níveis mais altos desta variável devem ser estudados, com aumento da região experimental referente a esta variável. A Figura 12 sugere que há um efeito negativo da presença de  $\text{FeSO}_4$  no meio de cultura. Estes resultados estão de acordo com as informações apresentadas na literatura (Lang e Wullbrandt, 1999; Desai e Banat, 1997, Guerra-Santos et al., 1984), onde se sugere que concentrações-traço de  $\text{Fe}^{2+}$  podem aumentar a produção de biosurfactante, mas acima de 2 mg a produção de biosurfactante pode não ocorrer (Guerra-Santos et al., 1984).



**Figura 12.** Otimização da produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Superfície de resposta para os efeitos  $\text{FeSO}_4$  ( $X_3$ ) e Glicerol ( $X_1$ ) na resposta Ramnose ( $Y$ ), fixando-se a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_2$ ) = -1 (1 g/L).



**Figura 13.** Superfície de resposta para os efeitos  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_2$ ) e glicerol ( $X_1$ ) na resposta ramnose ( $Y$ ) por *P. aeruginosa* UFPEDA 614, fixando-se a concentração de  $\text{FeSO}_4$  ( $X_3$ ) = -1 (0 g/L).

Para explicar este resultado e direcionar experimentos futuros, apesar dos problemas apresentados pelo modelo, a partir deste conjunto de experimentos pode-se sugerir que:

- (1) O tempo de fermentação aqui utilizado (7 dias) não tenha sido suficiente para a condução do processo, visto que, para a produção de 3,9 g/L de ramnose na otimização da relação C/N 55 (item 5.2.1) foram necessários 9 dias;
- (2) A variável glicerol (termo linear) não foi significativa dentro da faixa de concentração estudada. Provavelmente um aumento nas concentrações de glicerol poderia influenciar mais significativamente na resposta (Figura 12);
- (3) A falta de significância da variável  $\text{FeSO}_4$  (termo linear) sugere que este composto pode ser removido do meio de cultura. Isto pode ser visto na Figura 13. A significância da interação  $\text{FeSO}_4$  x Glicerol, mostrando um efeito negativo pode sugerir que, além de não ser necessário,  $\text{FeSO}_4$  é prejudicial quando combinado com o glicerol;
- (4) Quanto maior a relação C/N, representada pela baixa concentração de sulfato de amônio e alta concentração de glicerol, maior poderá ser a produção de biosurfactante.

## 5.4. CARACTERIZAÇÃO DO BIOSURFACTANTE

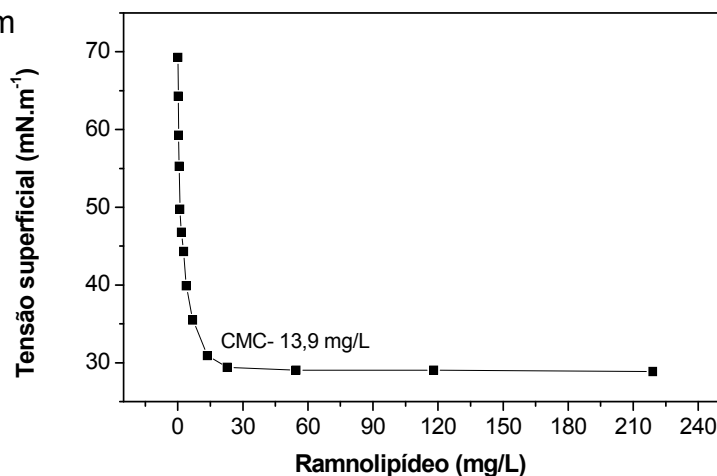
### 5.4.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 5.4.1.1. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) e Índice de Emulsificação (E%)

Para avaliar as propriedades físico-químicas do biosurfactante produzido por *P. aeruginosa*, foram determinados a concentração micelar crítica (CMC) e o índice de emulsificação ( $E\%$ ), usando o sobrenadante de cultura produzido de acordo com o item 4.8.4, com 7 dias de cultivo e com um teor de ramnose de 3,9 g/L. Note-se que aqui se utiliza os termos teor de ramnose, ramnolipídeos e biosurfactante como equivalentes.

A CMC é um importante parâmetro que indica qual é a concentração mínima necessária de biosurfactante em solução para que ocorra um abaixamento máximo de tensão superficial e interfacial, onde menores concentrações adicionadas representariam

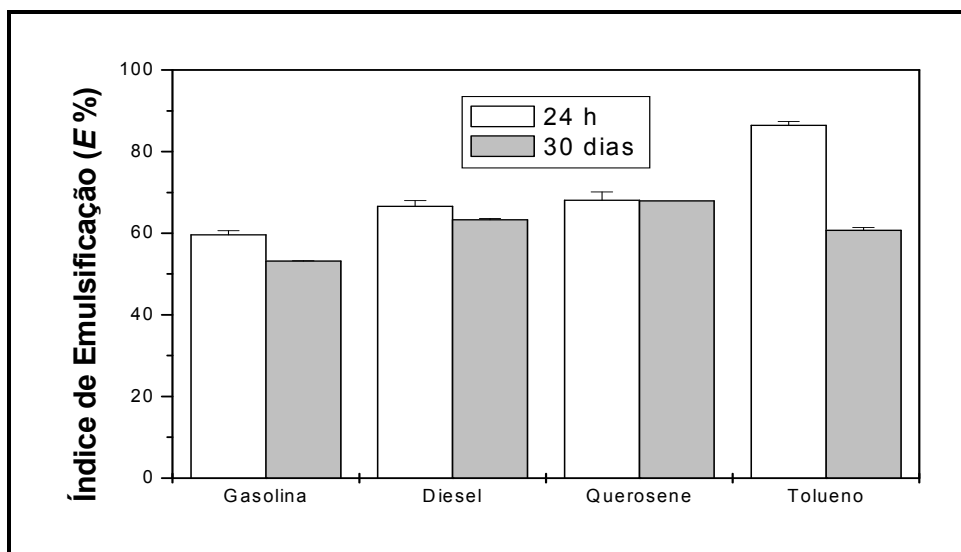
um fator econômico. Neste trabalho, a CMC (13,9



mg/ L) ocorreu quando a tensão superficial foi de 30 mN/m (Figura 14), que é muito mais baixa (27-54 mg/L) do que aqueles reportados para outros biosurfactantes (Soberón-Chavez et al., 2005) e para outras cepas de *P. aeruginosa* - 120, 108,8, e 19 mg/L respectivamente reportados por Benincasa et al. (2004), Haba et al. (2000), Santa Anna et al. (2001).

**Figura 14.** Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC) em função da tensão superficial (mN/m), utilizando-se diferentes diluições do sobrenadante de cultura contendo o biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614.

O índice de emulsificação do biosurfactante depois de 24 h (Figura 15) foi mais elevado para o tolueno ( $E = 86,4\%$ ) do que para os outros hidrocarbonetos ( $E$  médio de 60 a 70%). Depois de um mês, as diferenças entre os valores de  $E$  para todos os hidrocarbonetos testados diminuíram, apresentando médias entre 55 a 70%, sendo a emulsão com o querosene a mais estável,  $E_{30d} = 67,9\%$ . Estes resultados mostraram que o biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* possui uma excelente capacidade emulsificante mostrando a viabilidade de desenvolvimento de diferentes aplicações, notadamente as ambientais (Nistsche et al., 2005, Sheppard e Mulligan, 1987).



**Figura 15.** Índice de Emulsificação ( $E$ , %) do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 com vários hidrocarbonetos após 24 h (□) e após 30 dias (■). Os resultados representam valores médios de duplicatas.

## 5.5. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL

Segundo Mata-Sandoval et al. (1999), os biosurfactantes produzidos por cepas de *Pseudomonas* são constituídos de uma mistura de compostos do tipo ramnolipídeos que determina as suas propriedades tensioativas e cuja composição pode variar em função do microrganismo, da composição dos meios, das condições de processo e da idade da cultura.

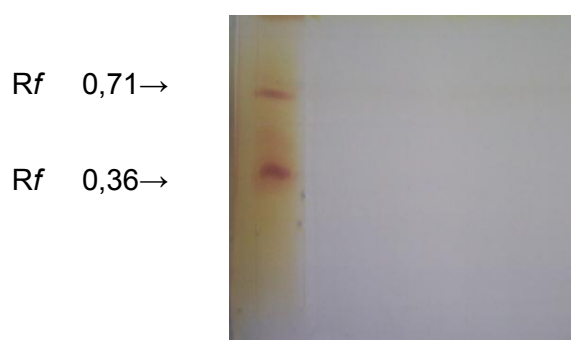
Até este ponto do trabalho, as evidências de produção de glicolipídeos, além do descrito na literatura, eram o teor de açúcares expressos em ramnose, e a formação de dois compostos com valores de  $R_f$  de 0,75 e 0,41 mostrados na Figura 10 (CCD).

O objetivo desta etapa do trabalho, portanto, foi o de caracterizar a composição da mistura de glicolipídeos produzida por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 e se possível, correlacionar a composição com as propriedades tensioativas da mistura.

### 5.5.1. Purificação das frações contidas na mistura de biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

O sobrenadante de cultura (7 dias de cultivo) foi extraído e purificado em coluna de sílica-gel (conforme item 4.7.2), o que resultou em 4 g do biosurfactante parcialmente purificado. Uma parte deste extrato (4 g) foi diluída 10 vezes com  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (2:1). Parte deste material foi novamente purificado por CCD preparativa. Na placa (Figura 16) observou-se novamente duas bandas visualizadas com orcinol, com  $R_f$ s de 0,71 e 0,36, confirmando os resultados prévios mostrados na Figura 10. De acordo com Arino et al. (1996), esses valores de  $R_f$  (0,71 e 0,36) são consistentes com os tipos de mono e diramnilipídeos, respectivamente.

As bandas foram então recuperadas pela raspagem das manchas e eluídas com uma nova porção de solventes, resultando em duas frações, aqui chamadas de  $F_1$  (11,35 mg) e  $F_2$  (20,26 mg), que foram posteriormente analisadas separadamente, como descritas abaixo (item 5.6.1 e 5.7).



**Figura 16.** Cromatografia em camada delgada preparativa da amostra purificada (diluída 10 vezes) do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. Sistema de solventes  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (65:15:2), desenvolvido com orcinol: $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $F_1$ ,  $R_f$  0,71;  $F_2$ ,  $R_f$  036.

A partir deste ponto do trabalho, considerando as informações da literatura e as evidências experimentais, passa-se a utilizar o termo *glicolipídeos* para designar os compostos contidos no sobrenadante de cultura produzido por *P. aeruginosa*.

## 5.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRACÇÕES

### 5.6.1. Análise dos Ácidos Graxos e Carboidratos

A composição dos ácidos graxos das frações purificadas,  $F_1$  e  $F_2$  (1 mg de

cada), foi determinada por CG-EM na forma de ésteres metílicos acetilados (Tabela 15). Em ambas as frações, o ácido graxo mais abundante (cerca de 70%) foi o ácido 3-hidroxicarboxílico ( $C_{10:0}$ ). Outros ácidos graxos foram encontrados em menores quantidades e identificados como 3-hidroxicarboxílico ( $C_{12:0}$ , cerca 10% para  $F_1$ , e de 16% para  $F_2$ ), 3-hidroxicarboxílico ( $C_{12:1}$ , cerca de 12 % para ambas  $F_1$  e  $F_2$ ) e o ácido 3-hidroxicarboxílico ( $C_{8:0}$ , cerca de 9% para  $F_1$  e 2% para  $F_2$ ).

**Tabela 15.** Composição dos ácidos graxos presentes nos glicolipídeos (frações  $F_1$  e  $F_2$ ) produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

Ácido Graxo <sup>a</sup>	<sup>b</sup> R <sub>t</sub>	% F <sub>1</sub>	% F <sub>2</sub>	Principais fragmentos Massa (m/z)
C <sub>10:0</sub>	4,457	68,4	68,8	81, 110, 153, 185, 201
C <sub>12:0</sub>	5,031	10,4	16,2	96, 155, 181, 213, 229
C <sub>12:1</sub>	5,080	12,0	13,0	79, 94, 121, 136, 149, 178, 211
C <sub>8:0</sub>	3,955	9,3	2,0	109, 125, 152, 173

a) Ésteres metílicos de ácidos graxos acetilados analisados por CG-EM (coluna DB-23), gás de arraste (He) fluxo de 1mL/min.

b) R<sub>t</sub> – tempo de retenção em min, de 50° C a 215 ° C (40 ° C min<sup>-1</sup>).

A composição em monossacarídeos dos glicolipídeos das frações  $F_1$  e  $F_2$  foi determinada na forma de derivados de alditóis acetatos, mostrando predominantemente a presença de ramnitol, o que confirmou a presença da ramnose em ambas as frações. A análise de metilação da fração  $F_1$  mostrou somente a presença do derivado metilado 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Ram, que corresponde a uma unidade de ramnose posicionada exclusivamente na extremidade não-redutora, como mostra a fragmentação primária (m/z 161, 175 e 131), e a fragmentação secundária (m/z 101 e 115) (Tabela 16) e que sugere que esta fração seja composta por um monoramnolipídeo.

Os dados mostrados na Tabela 16 também mostraram a presença de unidades monossacarídeas substituídas em F<sub>2</sub>, com os derivados 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Ram e 3,4-Me<sub>2</sub>-Ram, o que indica a existência de um diramnilípido em F<sub>2</sub>, cuja extremidade não-redutora está ligada ao C-2 da unidade da ramnose. Os derivados obtidos da fração F<sub>2</sub> mostraram como fragmentos de massa primários *m/z* 189, e secundário *m/z* 115, 129.

**Tabela 16.** Análise de acetatos de alditóis parcialmente O-metilados obtidos das frações metiladas (F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>) isoladas do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Acetatos de alditóis O-Me <sup>a</sup>	Principais fragmentos ( <i>m/z</i> ) F <sub>1</sub>	Principais fragmentos ( <i>m/z</i> ) F <sub>2</sub>	Ligação
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ram	101, 115, <b>131*</b> , <b>161*</b> , <b>175*</b>	101, 115, <b>131*</b> , <b>161*</b> , <b>175*</b>	t-Ram
3,4 Me <sub>2</sub> -Ram	-	115, 129, <b>189*</b>	2-Ram

t-Ram, extremidade não redutora ligada a ramnose

(\*) pico chave para fragmento primário

<sup>a</sup>- acetatos de alditóis O-Me analisados por CG-EM (coluna DB-23), gás de arraste (He) fluxo de 1mL/min.

Portanto, nesta etapa do trabalho concluiu-se que o biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 era composto por uma mistura de glicolípídeos, cujas frações principais, já evidenciadas mesmo em ensaios prévios por CCD (Figura 10) são formadas por um monoramnilípido (F<sub>1</sub>, R<sub>f</sub> 0,71, Figura 16) e por um diramnilípido (F<sub>2</sub>, R<sub>f</sub> 0,36, Figura 16). Ficou evidenciado também que os ácidos graxos mais abundantes presentes nas frações foram C<sub>10</sub> com traços de C<sub>8</sub>, C<sub>12</sub> e C<sub>12:1</sub>.

Em seguida, foram determinadas as posições das ligações e a estrutura dos glicolípídeos produzidos por *P. aeruginosa*.

## 5.7. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS GLICOLÍPÍDEOS

### 5.7.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As estruturas de  $F_1$  e  $F_2$  foram confirmadas pelas análises espectroscópicas de RMN, 1 D e 2 D baseadas nos experimentos de HMQC, COSY, TOCSY e ROESY. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) do  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  são mostrados na Tabela 17, cujos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , TOCSY e COSY estão no Anexo 1.

Nos glicolípídeos presentes em  $F_1$ , o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou os sinais situados entre  $\delta$  22,1 a 34,1 que podem ser atribuídos ao grupo  $-\text{CH}_2$  da região lipídica, e os sinais em  $\delta$  13,9, ao grupo  $-\text{CH}_3$ . Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  da região éster e do grupo  $-\text{COOH}$  apareceram em  $\delta$  171,7 e  $\delta$  174,3, respectivamente. O espectro HMQC mostrou um sinal na região anomérica do C-1 em  $\delta$  4,68/96,1, sugerindo uma ligação  $\beta\text{-L-Rhap}$  ( $1' \leftrightarrow 1$ )-hidroxiácido graxo (Figura 17). A configuração da ligação Rhap (ramnospiranosídeo) foi determinada pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  acoplado, fornecendo uma constante de acoplamento,  $J_{\text{C-H}} = 168 \text{ Hz}$ , que pode ser atribuída à unidade de  $\beta\text{-L-Rhap}$ . O sinal mais importante foi obtido pelo espectro ROESY, onde se observa a correlação (*cross peak*) em  $\delta$  4,68/4,07, que confirma a ligação  $\beta\text{-L-Rhap}$  ( $1' \leftrightarrow 1$ )-hidroxiácido graxo.

**Tabela 17.** Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos glicolípídeos (frações  $F_1$ , monoramnolípídeos e  $F_2$ , diramnolípídeos) contidos no biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 ( $\delta$  expressos em p.p.m)

Carbono	$F_1$		$F_2$	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
C-1'	4,68 <sup>a</sup>	96,1	4,74 <sup>a</sup>	94,9
C-2'	3,62	71,2	3,57	79,4 <sup>a</sup>
C-3'	3,53	67,8	3,56	68,5

C-4'	3,20	73,0	3,26	72,5
C-5'	3,54	70,7	3,59	70,51
C-6'	1,14	16,7	1,10	16,4
C-1''	-	-	4,73 <sup>a</sup>	102,5
C-2''	-	-	3,86	70,4
C-3''	-	-	3,4	68,1
C-4''	-	-	3,13	73,3
C-5''	-	-	3,56	70,9
C-6''	-	-	1,11	17,2
C-1	4,07 <sup>a</sup>	71,4	4,05 <sup>a</sup>	71,6
C-2	2,32	39,3	2,28	39,4
C-3		171,7	-	171,6
-COOH	-	174,3	-	173,8
-CH <sub>3</sub> <sup>b</sup>		13,9/13,8	-	14,0
C-4	5,24	70,8	5,24	70,8
C-5	2,38	39,3	2,38	38,9
-CH <sub>2</sub> <sup>b</sup>	1,13/1,14	22,14/34,1	1,37/1,40	22,1/34,2

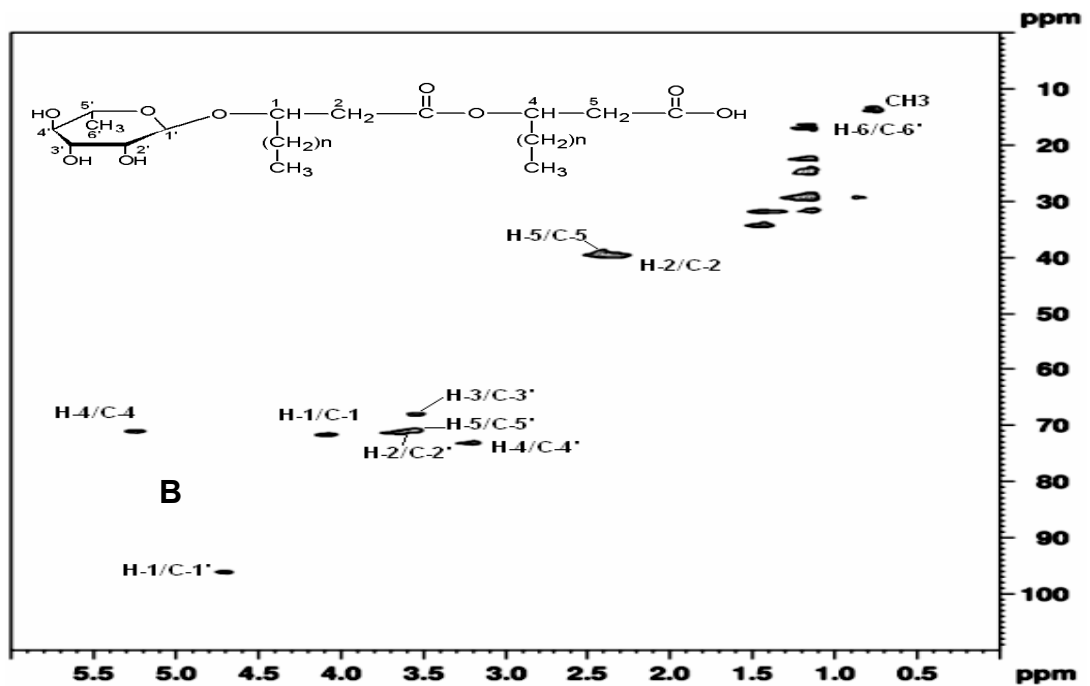
Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm de glicolípídeos; a - *cross-peak* ROESY, b - Sinais na região lipídica

Nos glicolípídeos presentes em F<sub>2</sub>, o espectro de RMN <sup>13</sup>C mostrou sinais na região lipídica em  $\delta$  14,0, que podem ser atribuídos ao grupo -CH<sub>3</sub> e em  $\delta$  22,1 a 34,2, que podem ser atribuídos aos grupos -CH<sub>2</sub>. Os sinais em  $\delta$  171,6 e  $\delta$  173,8 foram atribuídos à região éster e ao grupo -COOH, respectivamente.

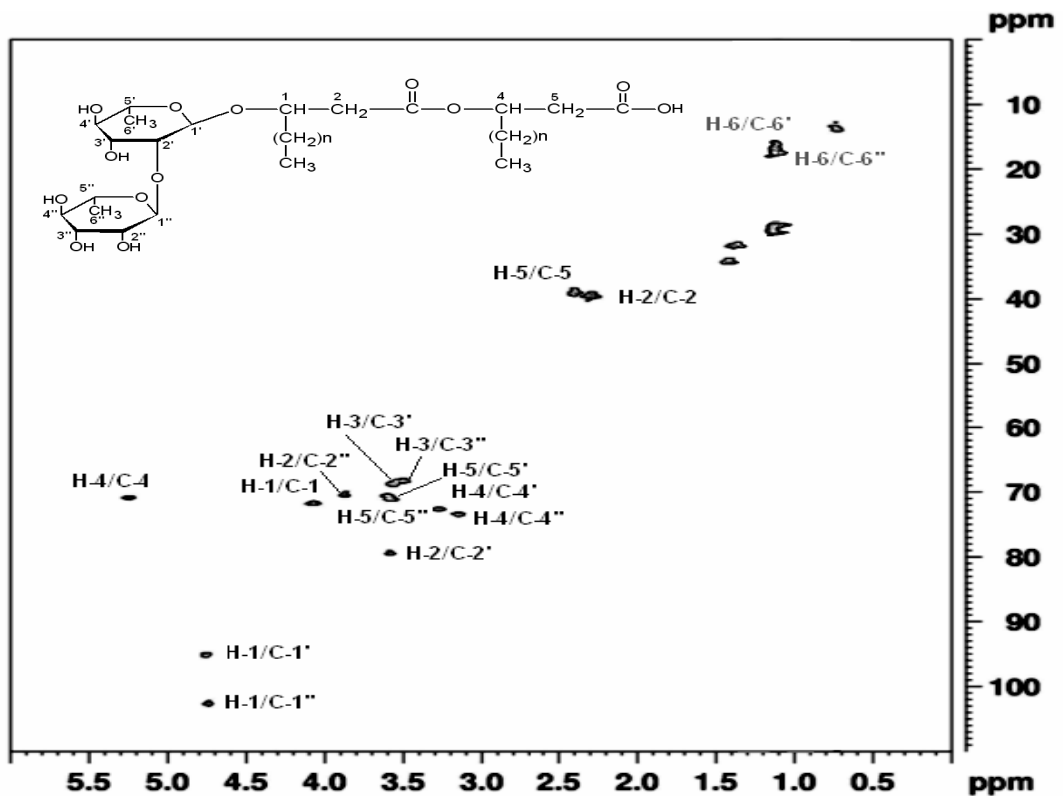
No espectro HMQC, as correlações (*cross-peaks*) da região do C-1 mostraram dois sinais: um em  $\delta$  4,74/94,9 e outro em 4,73/102,5, sugerindo ligações do tipo  $\beta$ -L-Rhap (1' $\leftrightarrow$ 1)-hidroxiácido graxo e  $\beta$ -L-Rhap (1'' $\rightarrow$ 2')- $\beta$ -L-Rhap respectivamente (Figura 18). Como para F<sub>1</sub>, ambas unidades de Rhap são  $\beta$ -L-Rhap, com uma constante de acoplamento  $J_{C-H}$  = 168 e 169 Hz, típica de uma configuração  $\beta$ -L-Rhap. No espectro ROESY, as correlações (*cross-peaks*) em  $\delta$

4,74/4,05 e 4,73/3,57 confirmaram a ligação  $\beta$ -L-Rhap (1' $\leftrightarrow$ 1)-hidroxiácido graxo e o C-2' O- substituído na unidade  $\beta$ -L-Rhap ( $\delta$  79.4), respectivamente.

As técnicas de RMN possibilitaram o esclarecimento da configuração dos glicolipídeos contidos na fração F<sub>1</sub> e na fração F<sub>2</sub>, cujas estruturas estão mostradas nas Figuras 17 e 18. Ambas as frações possuíam uma configuração  $\beta$ -L-Rhap. Além disto, permitiram confirmar a posição da ligação entre a (s) unidade (s) de ramnose e a cadeia de ácidos graxos, mas ainda ficou por esclarecer a composição dos homólogos dos ramnolipídeos, bem como a posição dos ácidos graxos nos glicolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614, que foram determinadas pelas técnicas de ESI-MS .



**Figura 17.** Espectro parcial de 2 D RMN (HMQC) dos glicolípídeos presentes na fração F<sub>1</sub> (monoramnolípídeos) isolada do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. (B) região anomérica  $\delta$  4,68/96,1 sugerindo uma ligação  $\beta$ -L-Rhap (1' $\leftrightarrow$ 1)-hidroxiácido graxo.



**Figura 18.** Espectro parcial de 2 D RMN (HMQC) dos glicolípídeos presentes na fração F<sub>2</sub> (diramnolípídeos) isolada do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614;  $\delta$  4,74/94,9; 4,73/102,5, sugere as ligações  $\beta$ -L-Rhap (1' $\leftrightarrow$ 1)-hidroxiácido graxo e  $\beta$ -L-Rhap (1'' $\rightarrow$ 2')- $\beta$ -L-Rhap.

### 5.7.2. Espectrometria de Massa por Ionização Electrospray (Electrospray-Ionisation-Mass-Spectrometry, ESI-MS) das frações isoladas do biosurfactante (F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>)

As análises por ESI-MS no modo negativo forneceram a composição dos homólogos dos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 quando cultivada em meio líquido, tendo o glicerol como fonte de carbono. As Figuras 19 e 20 ilustram os principais íons ( $m/z$  504 e 650), obtidos das frações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, que foram consistentes com as estruturas Ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) e  $\beta$ - $\alpha$ -Ramnosil (1 $\rightarrow$ 2)-Ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>), respectivamente. Íons menores foram obtidos da fração F<sub>1</sub>,  $m/z$  476 (consistente com Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> ou Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>),  $m/z$  529 (consistente com Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub> ou Rha-C<sub>12:1</sub>-C<sub>10</sub>) e  $m/z$  531 (consistente com Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> ou Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>) (Figura 19). Íons menores também foram obtidos para a fração F<sub>2</sub>,  $m/z$  622 (consistente com Rha<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> ou Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>),  $m/z$  676 (consistente com Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub> ou Rha<sub>2</sub>-C<sub>12:1</sub>-C<sub>10</sub>) e  $m/z$  678 (consistente com Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> ou Rha<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>) (Figura 20).

Além destas análises por ESI-MS, que confirmaram estrutura e a posição dos ácidos graxos, os glicolipídeos contidos nas frações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> foram submetidas ao modo de fragmentação Tandem-MS. O íon principal de F<sub>1</sub> ( $m/z$  504 - Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) resultou no fragmento  $m/z$  333, correspondendo à ruptura da ligação da cadeia ramnose-alquílica em  $m/z$  169, (Figura 19 B).

O modo de fragmentação Tandem-MS também foi conduzido em cada um dos íons menores obtidos em F<sub>1</sub> (Figura 19). O menor íon de F<sub>1</sub> em  $m/z$  476 forneceu os fragmentos menores  $m/z$  305 e 333, consistentes com as estruturas Rha-C<sub>8</sub> e Rha-C<sub>10</sub>, respectivamente. Para o íon em  $m/z$  529, foi obtido o fragmento  $m/z$  333, correspondente a Rha-C<sub>10</sub>, mostrando ser esta a única possibilidade, visto que, o menor fragmento esperado para o Rha-C<sub>12:1</sub>,  $m/z$  359, não estava presente, indicando que o ácido graxo hidroxinsaturado (C<sub>12:1</sub>) não estava diretamente ligado à molécula ramnosil. Em outras palavras, a única possibilidade de estrutura é Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>. O íon em  $m/z$  531 forneceu duas fragmentações menores, uma em  $m/z$  333 e outra em  $m/z$  361, representadas pelas estruturas Rha-C<sub>10</sub> e Rha-C<sub>12</sub>, respectivamente. Estes resultados indicam que os ácidos graxos saturados podem alterar sua posição em relação à molécula ramnosil, enquanto o ácido graxo insaturado estaria presente exclusivamente na porção terminal do ramnolipídeo.

A fração  $F_2$  também foi analisada por Tandem-MS, e o íon principal em  $m/z$  650 ( $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_{10}$ ), mostrou fragmentos menores, que representam a quebra da ligação éster entre as cadeias alquílicas, liberando  $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}$  ( $m/z$  479) e a unidade hidroxildecanoato ( $m/z$  169). Em  $m/z$  163 foi observada uma única unidade de ramnose (Figura 20 B).

Como em  $F_1$ , Tandem-MS foi conduzida nos íons menores presentes em  $F_2$ , tornando possível a determinação da posição dos ácidos graxos presentes na estrutura. O íon em  $m/z$  622 (correspondendo às estruturas  $\text{Rha}_2\text{-C}_8\text{-C}_{10}$  ou  $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_8$ ) forneceu os fragmentos menores em  $m/z$  451 ( $\text{Rha}_2\text{-C}_8$ ) e  $m/z$  479 ( $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}$ ), ambos representando a liberação do segundo ácido graxo. O fragmento em  $m/z$  676 forneceu um único fragmento em  $m/z$  479, correspondendo a  $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}$ . O íon em  $m/z$  505, correspondente a  $\text{Rha}_2\text{-C}_{12:1}$ , não estava presente. Como foi observado em  $F_1$ , a fração  $F_2$  também apresentou um ácido graxo hidroxinsaturado ( $\text{C}_{12:1}$ ) presente somente na posição terminal do ramnolípídeo, indicando ser esta a única possibilidade, correspondente à estrutura  $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_{12:1}$ . O íon em  $m/z$  678, representando as estruturas  $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_{12}$  e  $\text{Rha}_2\text{-C}_{12}\text{-C}_{10}$  mostrou íons em  $m/z$  479 ( $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}$ ) e  $m/z$  507 ( $\text{Rha}_2\text{-C}_{12}$ ), confirmando que os ácidos graxos saturados podem ocupar qualquer posição na estrutura.

A completa elucidação das estruturas de  $F_1$  e  $F_2$  está representada na Tabela 18, que fornece também a composição estrutural e a abundância relativa (%) da mistura de ramnolípídeos, calculadas pela intensidade relativa de seus correspondentes íons  $[\text{M} - \text{H}]^-$  ou fragmentos. Para os ramnolípídeos  $\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{10}$ ,  $\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{12:1}$ ,  $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_{10}$ ,  $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_{12:1}$ , a abundância relativa foi calculada pela integração das intensidades de seus íons ( $m/z$  504, 529, 650 e 676 respectivamente). Para os pares dos isômeros  $\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_8/\text{Rha-C}_8\text{-C}_{10}$ ,  $\text{Rha-C}_{12}\text{-C}_{10}/\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{12}$ ,  $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_8/\text{Rha}_2\text{-C}_8\text{-C}_{10}$  e  $\text{Rha}_2\text{-C}_{12}\text{-C}_{10}/\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_{12}$  com o mesmo valor de  $m/z$ , a abundância foi determinada pela intensidade relativa de seus fragmentos-chave (ver Tabela 18), produzidos pela remoção dos ácidos graxos que não estavam diretamente ligados à unidade ramnosil. Por exemplo, para os pares isoméricos  $\text{Rha-C}_8\text{-C}_{10}/\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_8$  ( $m/z$  475), procedeu-se o cálculo medindo-se a intensidade relativa dos fragmentos  $m/z$  305 ( $\text{Rha-C}_8\text{-C}_{10}$ ) e  $m/z$  333 ( $\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{10}$ ), e multiplicando-se estes valores pela intensidade do seu íon comum  $m/z$  475 (Déziel et al., 1999). O mesmo procedimento foi realizado para os isômeros  $\text{Rha-C}_{12}\text{-C}_{10}/\text{Rha-C}_{10}\text{-C}_{12}$ ,  $\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_8/\text{Rha}_2\text{-C}_8\text{-C}_{10}$  e  $\text{Rha}_2\text{-C}_{12}\text{-C}_{10}/\text{Rha}_2\text{-C}_{10}\text{-C}_{12}$ .

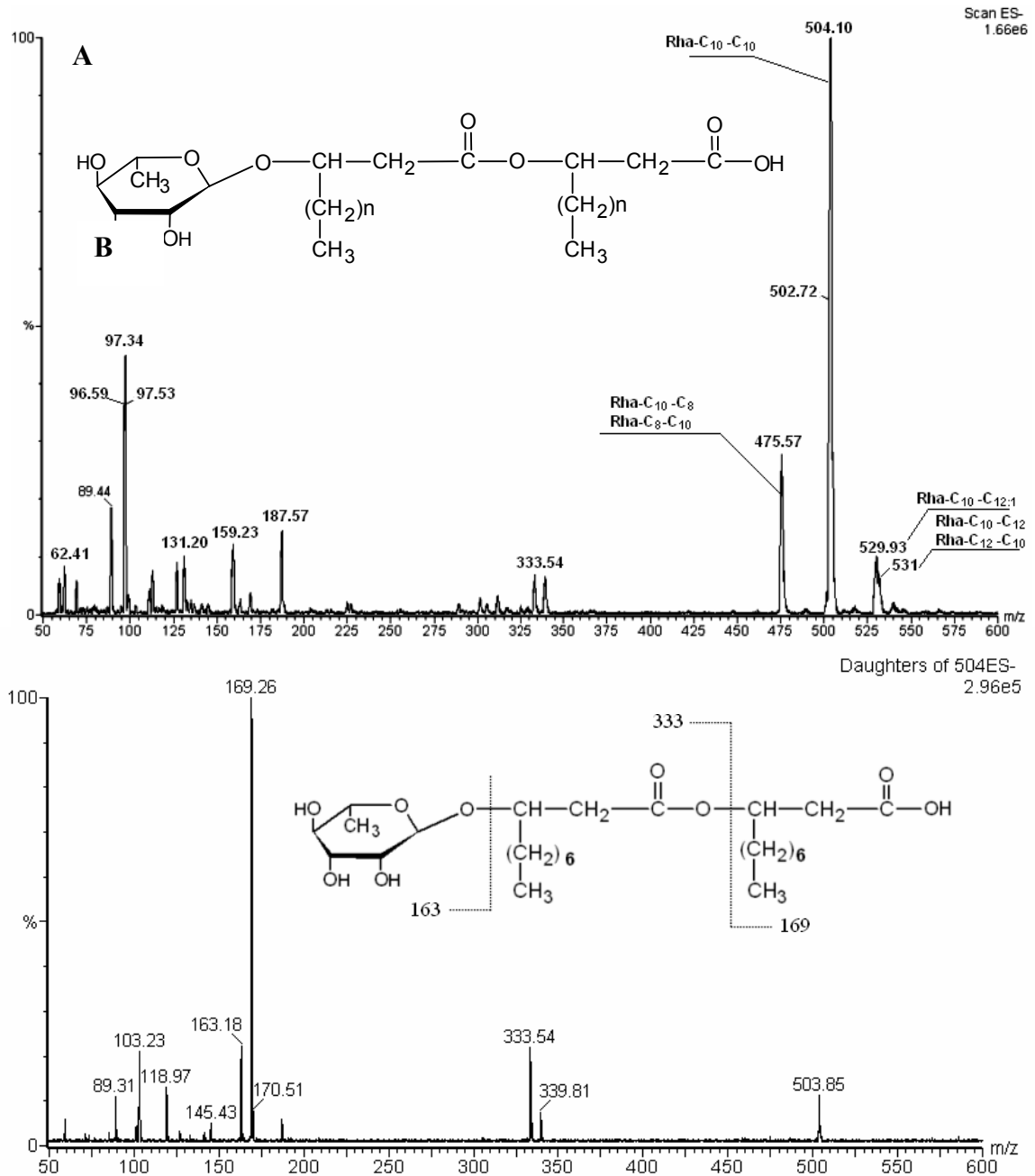
**Tabela 18.** Composição química e abundância relativa da mistura de ramnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

<b>Estrutura</b>	<b>Fragmentações</b>	<b>[M – H]<sup>-</sup></b>	<b>Abundância</b>
	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	<b>Relativa (%)</b>
Rha-C <sub>8</sub> - <b>C</b> <sub>10</sub>	<b>103,141,169, *305</b>	476	<b>11,7</b>
Rha-C <sub>10</sub> - <b>C</b> <sub>8</sub>	<b>103,141,169,*333</b>	476	<b>5,8</b>
<b>Rha-C</b> <sub>10</sub> - <b>C</b> <sub>10</sub>	<b>103,119,163,169,187,333</b>	504	<b>72,2</b>
Rha-C <sub>10</sub> - <b>C</b> <sub>12:1</sub>	<b>103,119,169,*333</b>	529	<b>5,8</b>
Rha-C <sub>10</sub> - <b>C</b> <sub>12</sub>	<b>103,163,169,197,*333</b>	531	<b>2,9</b>
Rha-C <sub>12</sub> - <b>C</b> <sub>10</sub>	<b>103,163,169,197,*361</b>	531	<b>1,6</b>
Rha <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> - <b>C</b> <sub>10</sub>	<b>103, 141,169,205,*451</b>	622	<b>5,3</b>
Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> - <b>C</b> <sub>8</sub>	<b>103, 141,169,205,*479</b>	622	<b>2,2</b>
<b>Rha</b> <sub>2</sub> - <b>C</b> <sub>10</sub> - <b>C</b> <sub>10</sub>	<b>145,163,169,205,246,479</b>	650	<b>77</b>
Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> - <b>C</b> <sub>12:1</sub>	<b>103,169,205,247,*479</b>	676	<b>7,4</b>
Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> - <b>C</b> <sub>12</sub>	<b>103, 143, 145, 163, 169, 197, 205, 247, *479</b>	678	<b>6,2</b>
Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> - <b>C</b> <sub>10</sub>	<b>103, 143, 145, 163, 169, 197, 205, 247, *507, 553</b>	678	<b>1,9</b>

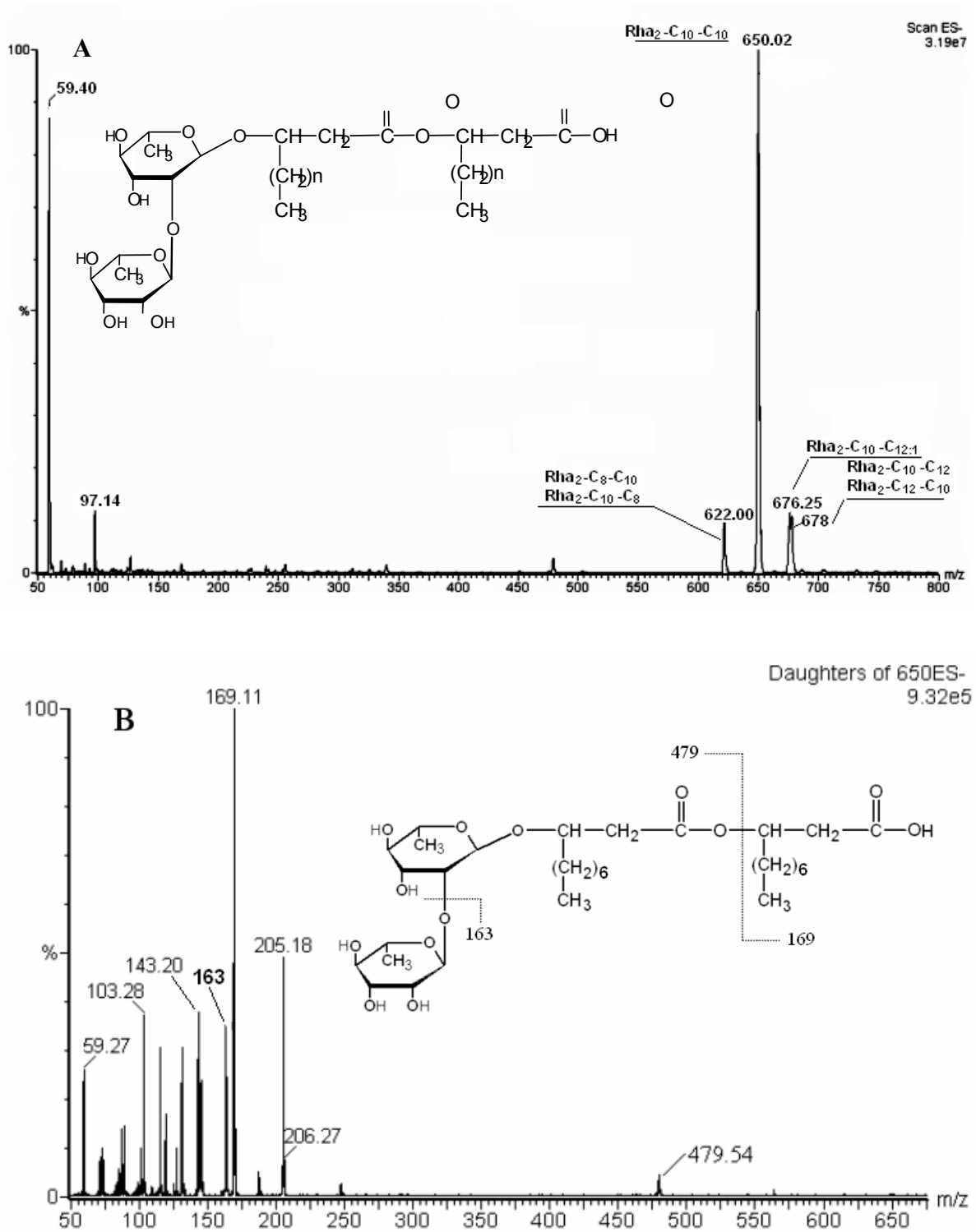
ESI-MS no modo Negativo.

\* fragmentos-chave que determinam a seqüência das ligações ramnosil e ácidos graxos hidroxilados.

As letras em negrito indicam a fragmentação que originaram os fragmentos-chave.



**Figura 19.** Espectrometria de massa (ESI-MS), modo íon negativo dos monoramnolípídeos contidos em F<sub>1</sub>. **(A)** Os íons mostram a provável estrutura: Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub> e Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>. **(B)** Estrutura do monoramnolípídeo mostrando os perfis de quebra obtidos por *Collision-induced dissociation* (CID) a *m/z* 504.10.



**Figura 20.** Espectrometria de massa (ESI-MS), modo íon negativo dos diramnlipídeos contidos em F<sub>2</sub>. **(A)** Os íons mostram a provável estrutura: Rha<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>/ Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>. **(B)** Estrutura do diramnlipídeo mostrando os perfis de quebra obtidos por *Collision-induced dissociation* (CID) a *m/z* 650.

### 5.7.3. Discussão dos resultados referentes à Caracterização Molecular e Estrutural do biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614

Os resultados correspondentes à determinação estrutural da mistura de ramnolipídeos mostraram que *P. aeruginosa* UFPEDA 614, nas condições de cultivo adotadas neste trabalho, para o glicerol como fonte principal de carbono, produziu uma mistura de ramnolipídeos contendo 12 homólogos incluindo os monoramnolipídeos (6) Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub> e Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> e os diramnolipídeos (6) Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>.

Os principais ramnolipídeos encontrados foram Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, sendo o Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> o mais abundante (ver Tabela 18). Usando a técnica ESI-MS, foi possível distinguir os pares isoméricos Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>/Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>, Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>/Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>, Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>/Rha<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>/Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>. Esta técnica também mostrou que, para cada par isomérico, o homólogo com a cadeia mais curta de ácido graxo adjacente à molécula de açúcar foi sempre mais abundante do que o homólogo com a cadeia mais longa. O ácido graxo insaturado C<sub>12:1</sub> somente foi encontrado na posição terminal do ramnolipídeo e para cada diramnolipídeo encontrado teve o seu homólogo monoramnolipídeo,

A Tabela 19 compara os resultados obtidos com os reportados na literatura para as outras cepas de *P. aeruginosa*.

Geralmente, os principais ramnolipídeos encontrados na mistura de glicolipídeos são Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>, como foi também o caso deste trabalho. Segundo Burger et al. (1963), que apresentam o metabolismo de síntese dos glicolipídeos, o monoramnolipídeo Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> é precursor do diramnolipídeo Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>. Isto sugere que, para cada diramnolipídeo presente, um homólogo monoramnolipídeo deveria também ser encontrado. Porém, isto nem sempre é verdadeiro, e ainda não está bem esclarecido (Déziel et al., 1999). A presença destes homólogos pode depender muito da variedade de cepas utilizadas e ao modo de condução do processo, como por exemplo, o crescimento em aerobiose ou anaerobiose, a imobilização das células bacterianas, uso de células em repouso, a idade da cultura, e a composição dos meios de cultura (Mata-Sandoval et al., 1999). Por exemplo, para a cepa *P. glumae* Manso Pajarron et al. (1993) encontraram em

maior abundância os diramnolipídeos Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>14</sub>-C<sub>14</sub>

Os números de homólogos reportados na literatura variam de 4 a 28 (Soberón-Chávez et al., 2005; Lang e Wullbrandt, 1999). Ramnolipídeos contendo somente uma unidade de ácido graxo β-hidroxi têm sido reportados (Haba et al., 2003b; Abalos et al., 2001; Déziel et al., 1999). No presente trabalho não foram encontrados estes compostos, podendo-se sugerir que não foram produzidos devido às diferenças entre a variedade de cepas ou as condições de fermentações utilizadas.

Déziel et al. (1999) sugeriram que ramnolipídeos contendo somente uma unidade de ácido graxo β-hidroxi sejam produtos derivados da hidrólise dos isômeros contendo dois ácidos graxos e que seriam produzidos sob condições estressantes para o microrganismo, como por exemplo, a presença de solventes orgânicos ou compostos tóxicos no meio de fermentação. Já Burger et al. (1963) propuseram que ramnolipídeos com uma única molécula de ácido graxo poderiam ser produzidos a partir de uma outra rota de biossíntese de ramnolipídeos.

As abundâncias relativas dos homólogos menores variaram significativamente. Neste estudo os menores homólogos continham os ácidos graxos β-hidroxi C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> e C<sub>12</sub>, com a predominância de C<sub>10</sub>. Homólogos contendo os ácidos graxos saturados C<sub>8</sub> e C<sub>12</sub> também foram encontrados por outros autores (Haba et al., 2003a; Abalos et al., 2001; Déziel et al., 1999). O ácido graxo insaturado C<sub>12:1</sub> somente foi encontrado na posição terminal do ramnolipídeo, ao contrário do trabalho de Déziel et al. (1999) que o encontraram em ambas as posições. Além do homólogo Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12:1</sub>, Déziel et al. (1999), reportaram outro ramnolipídeo insaturado, o Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>14:1</sub>. Em outro trabalho, Déziel et al. (2000) reportaram ramnolipídeos com duas cadeias diferentes de ácidos graxos β-hidroxi, a cadeia mais curta de ácidos graxo β-hidroxi adjacente à unidade de açúcar era sempre o homólogo mais abundante do que o homólogo de cadeia mais longa.

As misturas resultantes dos homólogos determinam as propriedades dos biosurfactantes e mesmo pequenas diferenças na composição da mistura podem levar a mudança relativamente grande nas propriedades físico-químicas.

Por exemplo, os monoramnolipídeos são menos solúveis, adsorvem mais fortemente junto a superfícies, requerem maiores valores de CMC para a solubilização de hidrocarbonetos e ligam-se a metais catiônicos mais fortemente do

que os correspondentes homólogos diramnolipídeos (Perfumo et al., 2006).

Um dos fatores mais importantes na elucidação da composição da mistura de homólogos é a metodologia de análise utilizada, pois a completa elucidação das estruturas envolve a utilização de métodos caros e que demandam tempo. Muitos trabalhos mostram apenas a composição qualitativa da mistura, sem fazer a quantificação, o que torna difícil a comparação dos resultados. Dos trabalhos citados, apenas Déziel et al. (1999), Haba et al. (2003b) e Benincasa et al. (2004) utilizaram metodologia HPLC/MS usando ESI que permitiu a elucidação das estruturas. Entretanto, os meios e as cepas utilizadas foram diferentes, o que pode explicar as diferenças encontradas entre nossos resultados e de outros trabalhos.

Arino et al. (1996) e Perfumo et al. (2006) usaram a mesma fonte de carbono (o glicerol), que o do presente trabalho. Infelizmente, esses autores caracterizaram a composição da mistura de ramnolipídeos somente em termos da composição de ácidos graxos, e não separaram nem quantificaram os pares isoméricos Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>/Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> e Rha<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>/Rha<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub>. Devido a isto, não foi possível uma comparação direta entre os dois trabalhos, o que poderia ter sido útil na determinação da participação da cepa na composição da mistura de ramnolipídeos.

No presente trabalho a técnica de ESI-MS esclareceu a estrutura da mistura dos ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 fornecendo a seqüência dos ácidos graxos nos glicolipídeos e a massa molar e a abundância relativa de todos os homólogos encontrados.

**Tabela 19.** Composição da mistura de ramnolipídeos produzidos por diferentes cepas *Pseudomonas aeruginosa*

Mono-ramnolipídeo (2 ácido graxos)	Di-ramnolipídeo (2 ácidos graxos)	Mono/Di-ramnolipídeo (1 ácido graxo)	Referência
Principal fonte de Carbono = Glicerol (número de homólogos encontrados = 12)			
*Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	*Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	n.d. (não detectado)	Este trabalho
Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>		
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>		
Glicerol (10)			
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub>	Perfumo et al. 2006
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	Rha-C <sub>10</sub>	
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>		
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>		
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>		
Óleo de fritura de soja (2)			
n.d.	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	n.d.	Thanomsub et al. 2006
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>		
Soapstock (6)			
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	*Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	n.d	Benincasa et al. 2004
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>		
*Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>		
Ácidos graxos do resíduo do óleo de soja (9)			
*Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	*Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	Rha-C <sub>8:1</sub>	Haba et al. 2003b
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	Rha-C <sub>12:2</sub>	
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>		

**Tabela 19.** Composição da mistura de ramnolípídeos produzidos por diferentes cepas *Pseudomonas aeruginosa* (Continuação)

Óleos de fritura (14)			
*Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	Rha-C <sub>12:1</sub>	Haba et al. 2003b
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>		
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>		
Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>		
n.d.	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>14:1</sub>		
Oliva/girassol			
*Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	*Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub>	Haba et al. 2003a
Resíduos oleo de soja refinado (5)			
*Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>		Rha-C <sub>12:2</sub>	Abalos et al. 2001
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>		Rha-C <sub>8:2</sub>	
Rha-C <sub>12:1</sub> -C <sub>10</sub>			
Corn oil (4)			
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	*Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	n.d	Mata-Sandoval et al. 1999
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>		
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub> -H		
Manitol e naftaleno (28)			
*Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	*Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	*Rha-C <sub>10</sub> ,	Déziel et al. 1999
Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	Rha-C <sub>12</sub>	
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	Rha-C <sub>8</sub>	
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>8</sub>	
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub>	
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12:1</sub>	
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub>	
Rha-C <sub>12:1</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12:1</sub> -C <sub>10</sub>		
Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>8</sub>		

**Tabela 19.** Composição da mistura de ramnolipídeos produzidos por diferentes cepas *Pseudomonas aeruginosa* (Continuação)

	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12:1</sub> -C <sub>12</sub>		
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>14:1</sub>		
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>12:1</sub>		
Substrato não especificado (7)			
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	n.d	Manso Pajarron et al.
	*Rha <sub>2</sub> -C <sub>14</sub> -C <sub>14</sub>		1993
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>		
	*Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>		
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>		
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>14</sub> -C <sub>12</sub>		
	Rha <sub>2</sub> -C <sub>16</sub> -C <sub>14</sub>		
Glucose (14)			
*Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>10</sub>	n.d.	Rendell et al. 1990
Rha-C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>10</sub>		
RhaC <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>8</sub>		
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -C <sub>10</sub>		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12</sub>		
Rha-C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>12</sub> -C <sub>12</sub>		
Rha-C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>	Rha <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>12:1</sub>		

---

\*ramnolipídeos não predominantes na amostra

## 6. CONCLUSÕES

### (1) Estudos da produção de biosurfactantes de *P. aeruginosa* UFPEDA 614

Resultados obtidos nas fases iniciais deste trabalho mostraram que, utilizando-se o glicerol como principal fonte de carbono e uma fonte inorgânica de nitrogênio, a maior produção do biosurfactante ocorre quando há uma limitação da fonte de nitrogênio, caracterizada por uma relação carbono-nitrogenio (C/N) de 55. Neste caso, obteve-se um máximo de 3,9 g do biosurfactante por litro de meio de cultura.

A análise dos resultados referentes à otimização da produção do biosurfactante por delineamento fatorial estudando os efeitos dos parâmetros concentração de glicerol, de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , em ausência ou presença de  $\text{FeSO}_4$ , forneceram um modelo matemático que explica 87,91% da variação de respostas. Embora a falta de ajuste para a regressão tenha sido não significativa, ( $p= 0,3052$ ), os erros de ajustamento não se apresentaram normalmente distribuídos, mostrando que o modelo não pode ser aplicado integralmente. Entretanto, é possível obter-se algumas conclusões deste conjunto de experimentos, que poderão auxiliar na continuação de estudos de otimização futuros, sendo as principais:

A variável glicerol (termo linear) não foi significativa dentro da faixa de concentração estudada. Provavelmente um aumento nas concentrações de glicerol poderia influenciar mais significativamente na resposta

A falta de significância da variável  $\text{FeSO}_4$  (termo linear) sugere que este composto pode ser removido do meio de cultura.

Relações C/N elevadas, representadas pela baixa concentração de sulfato de amônio e alta concentração de glicerol, poderiam propiciar uma maior produção do biosurfactante.

## (2) Caracterização Físico-Química e Estrutural

O biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 apresentou excelentes propriedades tensioativas, com uma baixa concentração micelar crítica (CMC, 13,9 mg/L), sendo capaz de produzir emulsões de hidrocarbonetos com elevada estabilidade após 24 h ( $E=60-86\%$ ) e que se mantêm estáveis ( $E=55$  a  $70\%$ ) por no mínimo 30 dias.

O biosurfactante é produzido na forma de uma mistura de ramnolipídeos, constituída por monoramnolipídeos e diramnolipídeos.

Os ácidos graxos mais abundantes foram o ácido 3-hidroxi-decanoico ( $C_{10:0}$ ) com traços de: 3-hidroxi-octanoico ( $C_{8:0}$ ), 3-hidroxi-dodecanoico ( $C_{12:0}$ ) e 3-hidroxi-dodecenoico ( $C_{12:1}$ ).

As análises de metilação por GC-MS aliadas a outras técnicas (ESI-MS e RMN 1 D, e 2 D) mostraram que os ramnolipídeos produzidos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614 são formados principalmente pelo diramnolipídeo,  $\beta$ - $\alpha$  Ramnosil (1 $\rightarrow$ 2)-Ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato ( $Rha_2-C_{10}-C_{10}$ ) e pelo monoramnolipídeo, Ramnosil- $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato ( $Rha-C_{10}-C_{10}$ ).

Outros ramnolipídeos também foram encontrados em proporções menores: (5) homólogos monoramnolipídeos,  $Rha-C_{10}-C_8$ ,  $Rha-C_8-C_{10}$ ,  $Rha-C_{10}-C_{12}$ ,  $Rha-C_{12}-C_{10}$ ,  $Rha-C_{10}-C_{12:1}$  e (5) homólogos diramnolipídeos,  $Rha_2-C_{10}-C_8$ ,  $Rha_2-C_8-C_{10}$ ,  $Rha_2-C_{10}-C_{12:1}$ ,  $Rha_2-C_{12}-C_{10}$  e  $Rha_2-C_{10}-C_{12}$ .

Os pares isoméricos  $Rha-C_{10}-C_8/Rha-C_8-C_{10}$ ,  $Rha-C_{10}-C_{12}/Rha-C_{12}-C_{10}$ ,  $Rha_2-C_{10}-C_8/Rha_2-C_8-C_{10}$  e  $Rha_2-C_{12}-C_{10}/Rha_2-C_{10}-C_{12}$ , com cadeias mais curtas adjacentes à molécula de açúcar, sempre são mais abundantes do que os homólogos com cadeia mais longa.

Usando a técnica ESI-MS, foi possível distinguir entre os pares isoméricos  $Rha-C_{10}-C_8/Rha-C_8-C_{10}$ ,  $Rha-C_{10}-C_{12}/Rha-C_{12}-C_{10}$ ,  $Rha_2-C_{10}-C_8/Rha_2-C_8-C_{10}$  e  $Rha_2-C_{12}-C_{10}/Rha_2-C_{10}-C_{12}$ .

As técnicas analíticas utilizadas neste trabalho propiciaram a completa elucidação da composição do biosurfactante produzido por *P. aeruginosa* UFPEDA 614, contribuindo para futuros desenvolvimentos de aplicações de biosurfactantes produzidos por cepas nativas.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este é um trabalho que abre muitas novas perspectivas. Trabalhos futuros poderão abordar os seguintes temas:

- Otimização da produção do biosurfactante, aumentando-se o tempo de fermentação e a faixa de concentração do glicerol utilizada, explorando as áreas de máxima resposta apontadas pelo delineamento fatorial.
- Otimização da produção de biosurfactantes utilizando outros indutores, como por exemplo: solventes, petróleo e óleos vegetais.
- Desenvolver estudos sobre efeito da composição do meio de cultura e da idade da cultura na composição da mistura de ramnolipídeos e nas suas propriedades tensioativas.
- Isolar as frações majoritárias da mistura e verificar a relação estrutura-função de cada fração.
- Utilizar o processo de fermentação no estado sólido com resíduos agroindustriais para diminuir os custos da produção do biosurfactante.
- Desenvolver estudos de aplicação do biosurfactante.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M.R.; CASALS, M. GARCIA; F. MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v. 17, p. 1367-1371, 2001.

ANG, E.L.; ZHAO, H.; OBBARD, J.P. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. **Enzyme and Microbiol. Technology**, v. 37, p. 487-496, 2005.

ARINO, S.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J-P. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 45, p. 162-168, 1996.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA I.; MANRESA A. Chemical structure, surface properties and biological actives of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1-8, 2004.

BENINCASA, M.; CONTIEIRO, J.; MANRESA A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **J. Food Eng.** V. 54, p. 283-288, 2002.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, p. 455-475, 1960.

BREDENBRUCH, F.; NIMTZ, M.; WRAY V.; MORR, M.; MULLER, R.; HAUSSLER, S. Biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 3630-3635, 2005.

BURGER, M.M.; GLASER, R.M.; BURTON. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Biol. Chem.**, v. 238, p. 2595-2602, 1963.

CAMPOS-GARCÍA, J.; CARO, A.D.; NÁJERA, R.; MILLER-MAIER, R.M.; AL-TAHHAN, R.A.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. The *Pseudomonas aeruginosa* *rhIG* gene encodes an NADPH-dependent  $\beta$ -ketoacyl reductase Vich is specifically involved in rhamnolipid síntesis. **J. of Bacteriology**, 180 (7), p.4442-4451, 1998.

CARRILO, P.G et al. Isolation and selection of biosurfactant- producing. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 12, p. 82-84, 1996.

CHAYABUTRA, C.; WU, J.; JU, L.K. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification effects of limiting nutrients and carbon substrate. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 732, p. 25-33, 2001.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **J.Applied. Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

COSTA, S.G.V.A.O.; NISTSCHCKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIEIRO J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian nature oils. **Process. Biochemistry**, v. 41, p. 483-488, 2006.

COOPER D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-Active agents from two *Bacillus* species. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.53, p.224-229, 1987.

DESAI, J.D. ; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.61, p. 47-64, 1997.

DÉZIEL, E. ; LÉPINE, F. ; DENNIE, D. ; BOISMENU, D. ; MAMER O.A. ; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1440, p 244-252, 1999.

DÉZIEL, E.; LÉPINE, F., MILOT, S., VILLEMUR. R. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing cultures of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1485, p. 145-152, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS P.A.; SMITH, F. Colorimetric method of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p 350-356, 1956.

EDWARDS, J.R.; HAYASHI, J.A. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. **Archives of Biochemistry and biophysics**, v. 111. p. 415-421, 1965.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPELLI, O. FIECHTER. A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 48 , p.302-305, 1984.

HABA, E.; ESPUNY, M.J.; BUSQUETS, M. MANRESA A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **J. Appl. Microbiol.**, v. 88, p. 379-387, 2000.

HABA, E.; A. PINAZO.; JÁUREGUI, O.; ESPUNY, M.J.; INFANTE, M.R.; M. MANRESA A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of

rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, p.316-322, 2003a.

HABA, E ABALOS; A. JAUREGUI, O. ESPUNY.; M.J MANRESA, A. Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Surfactants Deterg.**, v. 6, p. 155-161, 2003b.

HISATSUKA, H.I; NAKAHARA, T. SANO, N; YAMADA, K. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. **Agr. Biol. Chem.**, v. 35, n. 5, p. 686-692, 1971.

ITOH, S.; H. HONDA, F.; TOMITA, and SUZUKI, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-parafin (C12, C13 and C14 fractions). **J. Antibiotics**, v. 12, p. 855-859, 1971.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LIEDGREN, H.; LINDBERG, B.; LÖNNGREN, J. A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. **J. Chem. Commun, Univ. of Stockholm**, v. 8, p. 1-70, 1976.

JARVIS, F.G.; JOHNSON, M.J. A glycol-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. of the Am. Chem. Soc.**, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

KRIEGER, N. **Amido de milho pré-gelatinizado por extrusão: Estudo das variáveis de processo e do efeito da adição de emulsificantes**. 196 f, Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1988.

KRÜSS. Processor Tensiometer K12. Hamburg, 1994. Manual.

KUHN, R.; TRISCHMANN, H.; LOW, I. Zur permethylierung von zucken und glikosiden. **Angew. Chemi.**, v. 67, n. 1, p. 32, 1955.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface, Science**, v. 7, p. 12-20, 2002.

LANG, S.; WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LEE, K.M.; HWANG, S.H.; HA, S.D.; JANG, J.H.; LIM, D.J.; KONG, J.Y. Rhamnolipid production in batch and fed-batch fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 9, p. 267-273, 2004.

LINHARDT, R.J.; BAKHIT, R.; DANIELS, L.; MAYERL, F.; PICKENHAGEN, W. Microbially produced rhamnolipid as a source of rhamnose **Biotechnology Bioengineering**, v. 33, p. 365-368, 1987.

LYCZAK, J.B.; CANNON, C.L.; PIER, G.B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes Infect** **2.**, p. 1051-1060, 2000.

MAIER, R.M., SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. **Appl Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strain at thermophilic conditions. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v.74, n.7, p. 887-889, 1997.

MANRESA A. M.; BASTIDA J.; MERCADÉ M. E.; ROBERT M.; C DE ANDRES. ; ESPUNY M. J. and GUINEA, J. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **J. Ind. Microbiol**, v.8, p.133-136, 1991.

MANSO PAJARRON, A., De KOSTER, C.G., HEERMA, W., SCHMIDT, M., HAVERKAMP, J. Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast-atom-bombardment tandem mass-spectrometry. **Glycoconjug. J.**, v. 10, p. 219-226, 1993.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, and TORRENTS, A. High-performance liquid chromatography of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. **J. Chromatogr. A.**, v. 864, p. 211-220, 1999.

MATA-SANDOVAL, J.C.; KARNS, and TORRENTS, A. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UG2. **Microbiol. Res.**, v. 155, p. 249-256, 2001.

MOURA, R.A.; WADA, C.S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T.V. de in: Atheneu (Eds), Técnicas de Laboratório, São Paulo 3 ed 1998 p. 63-64.

MULLER-HURTIG, R.; WAGNER F., BLASZCYK, R., KOSARIC, N. Biosurfactants for environmental control. In: Kosaric, N. (ed) Biosurfactants- Production, properties and applications. Surfactant science series. Eds. Marcel Dekker: New York: 1993, v. 48, 483 p.p. 447-469.

MULLIGAN, C. N.; YOUNG, R.N.; GIBBS, B.F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 85, 111-125p, 2001.

MULLIGAN, C. N.; EFTEKAI, F. Remediation with surfactant foam of PCP contaminated soil. **Engineering Geology**, v. 70, 269-279p, 2003.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants, **Environ. Pollut.**, v.133 p.183-198, 2005.

NEILSON W.; ARTIOLA, J.F.; MAIER, R.M. Characterization of lead removal from contaminated soils by non-toxic soil-washing agents. **J. of Environmental Quality**, v.32, p.899-908, 2003.

MATSUFUJI, M.; NAKATA, K.; YOSHIMOTO, A. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. **Biotechnol. Lett.** v.19, p. 1213-1215, 1997.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M.; SIDDHARTHA, G.V.A.; COSTA, O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules., **Biotechnol. Prog.**, v. 21 1593-1600, 2005.

OCHSNER, U.A.; HEMBACH. T., FIECHTER. A. Production of rhamnolipid biosurfactants. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 53, p. 90-118, 1995.

PARRA, J.L.; GUINEA, J.; MANRESA, A.; ROBERT, M.; MERCADE, M.E. COMELLES, F.; BOSCH, M.P. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.66, p. 141-145, 1989.

PATEL, R.M.; DESAI, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, 91-94, 1997.

PERFUMO, A.; BANAT, I. M.; CANGANELLA, F.; MARCHANT, R. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* APO2-1. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.72, p.132-138, 2006.

PILJAC G.; PILJAC V. Immunology activity of rhamnolipids. **Chemical Abstracts**, v. 92, p. 16-30, 1995.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnol. Prog.**, v.18, p. 1277-1281, 2002

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTOAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, 159-168p, 2003.

REILING, H.E.; THANEI-WYSS, U.; GUERRA-SANTOS, L.H.; HIRT, R.; KAPPELI, O. and FIECHTER, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. And Environ. Microbiol.** v, 51, n. 5, p. 985-989, 1986.

RENDELL, N.B., TAYLOR, G.W., SOMERVILLE, M., TODD, H., WILSON, R., COLE, P. J. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1045, 189-193. 1990.

ROBERT, M.; MERCADE, M.E.; BOSCH, M.P.; ESPUNY, M.J.; MANRESA, M.A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v.11, n. 12, p. 871-874, 1989.

SÁNCHEZ, M.; TERUEL, J.A.; ESPUNY, M.J.; MÁRQUES, A.; ARANDA, F.J.; MANRESA, A.; ORTIZ, A. Modulation of the physical properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry and Physics of lipids**, v. 142, p. 118-127, 2006.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA, JR, N.; ALVES, T.L.M.; MENEZES, E.P.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactant from a new and promising stain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.91-93, p.459-467, 2001.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA, JR N.; ALVES, T.L.M.; MENEZES, E.P.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Braz. J. Chem. Eng.**, v.19, p. 159-166, 2002.

SANTOS, C.F.C. **Produção, purificação e caracterização de biosurfactante produzidos por linhagens de *Bacillus subtilis***. 214 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2001.

SANTOS, S.A. **Produção de ramnolípídeos por *Pseudomonas aeruginosa***. 109 f. Tese (Doutorado em Ciência Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; SOUZA L.M.; CZELUSNIAK, P.A.; IACOMINI, M. Rapid synthesis of partially O-methylated alditol acetate standards for GC-MS: some relative activities of hydroxyl groups of methyl glycopyranosides on Purdie methylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340 p. 731-739, 2005.

SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.27, p.110-116, 1987.

SING, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: part 2. Applications aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99-121, 2007.

SKIPSKI, V.P. Thin-layer chromatography of neutral glycolipids. **Methods Enzymol.**, v.35, p.396-425. 1975.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, p. 718-725, 2005.

SYLDATK, C.; WAGNER, F. **Production of Biosurfactants.** In: **Kosaric, N.; Cairns, W.J.L.** Biosurfactants and Biotechnology. Eds. Marcel Dekker: New York: 1987, v. 25, 342 p.p. 89-119.

SYLDATK, C.; LANG, S.; MATULOVIC, U.; WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874. **Z. Naturforsch**, v. 40c, p. 61-67, 1985.

STANGHELLINI M.E.; MILLER, R.M. Biosurfactants – their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. **Plant Dis.**, n. 81, p. 4-12, 1997.

THANOMSUB, B., PUMEECHOCKCHAI, W., LIMTRAKUL, A., ARUNRATTIYAKORN, P., PETCHLEELAHA, W., NITODA, T., KANZAKI, H. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2457-2461, 2006.

VENKATA, K.R.; KARANTH, N.G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 45, p. 249-257, 1989.

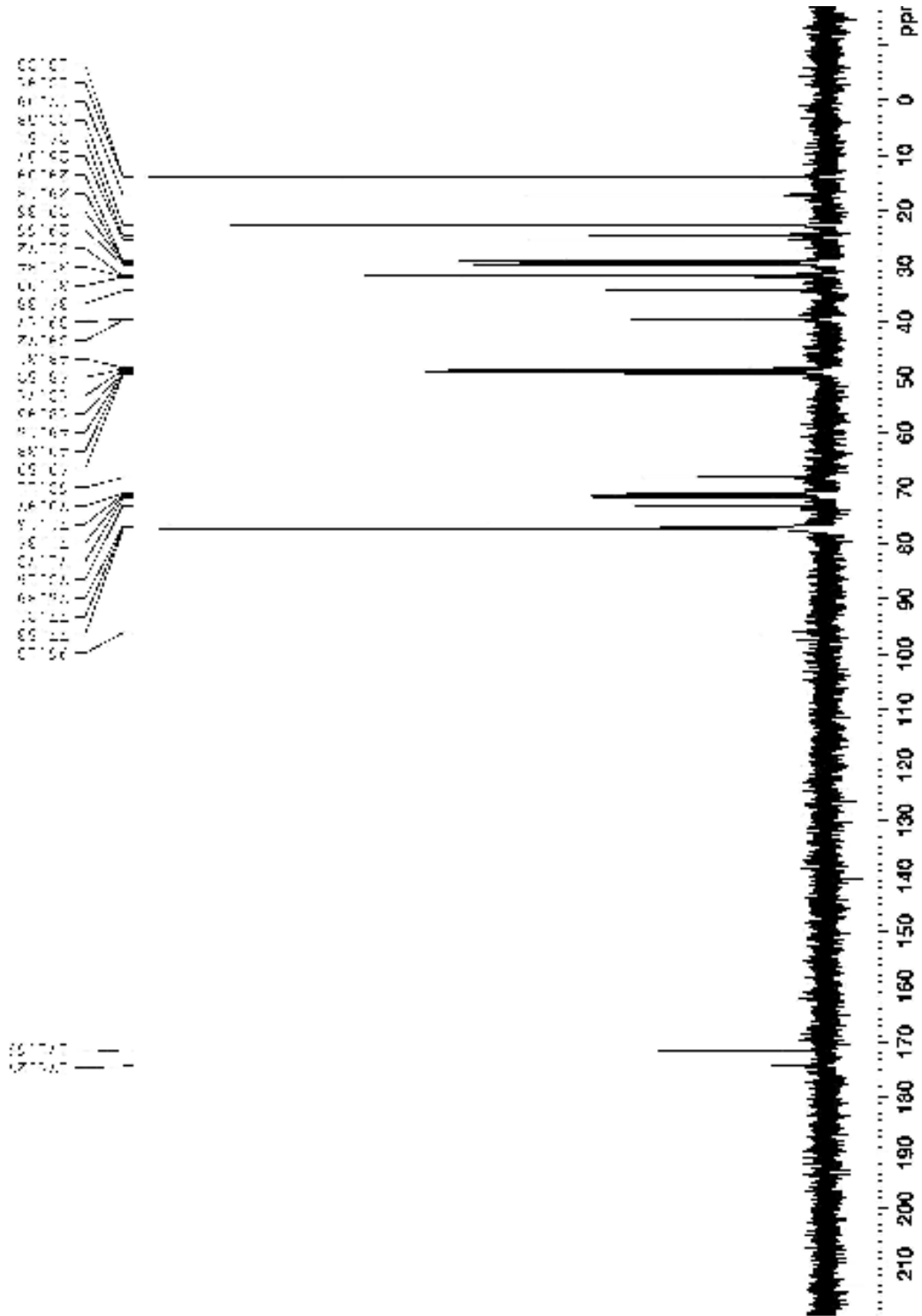
YOUSSEF, N. H.; DUCAN, K.E.; NAGLE, D. P.; SARVAGE, K. N.; KNAPP, R.M.; MCIRNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **J. Microbiol. Methods**, v. 56, p. 339-347, 2004.

**ANEXOS**

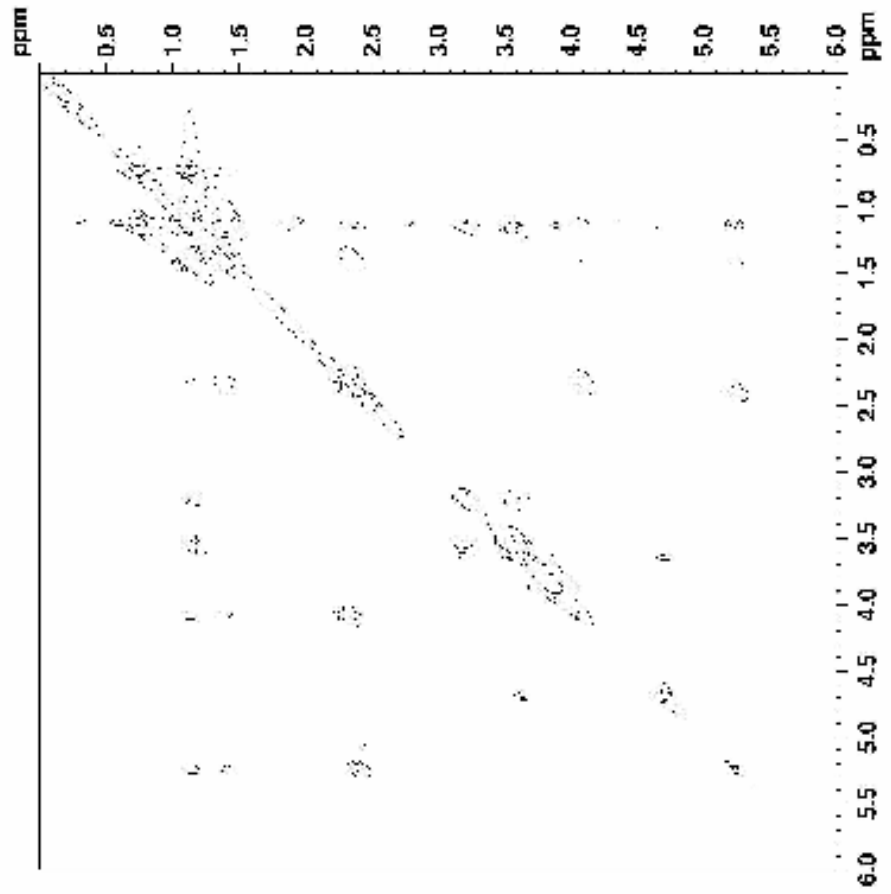
---

# ANEXO 1

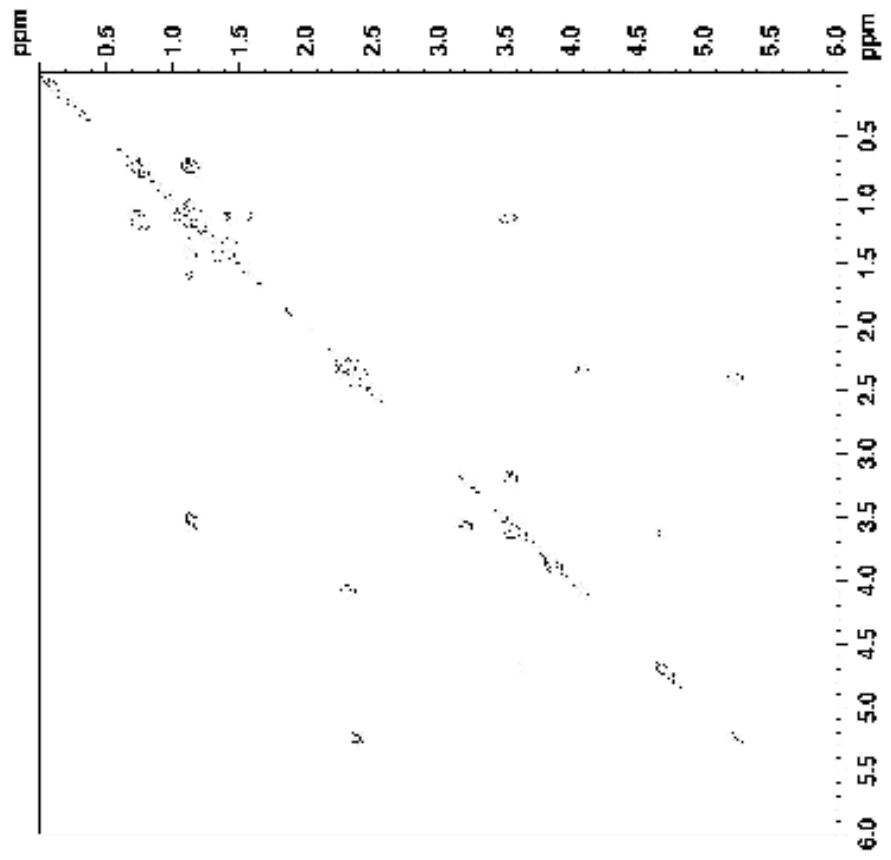
## Espectros de RMN de <sup>13</sup>C da fração F<sub>1</sub>



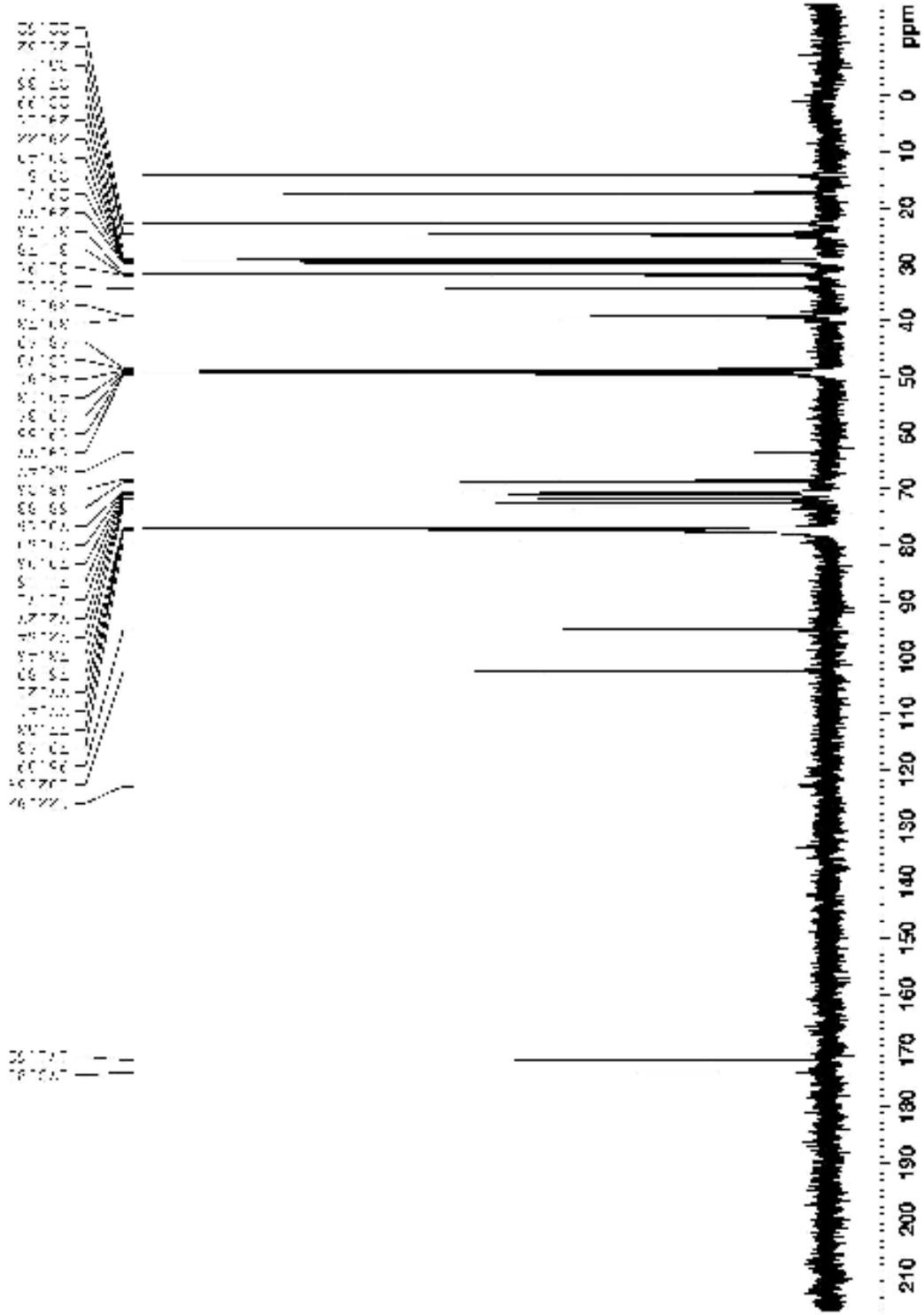
Espectro 2D de RMN TOCSY da fração F<sub>1</sub>



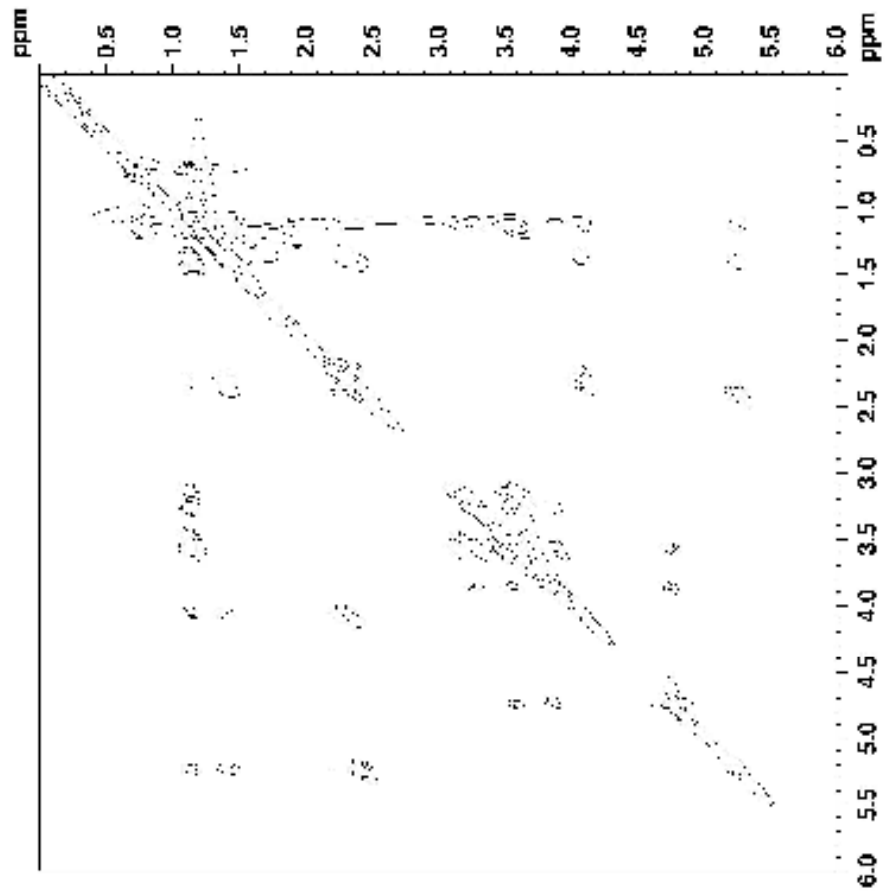
Espectros 2D de RMN COSY da fração F<sub>1</sub>



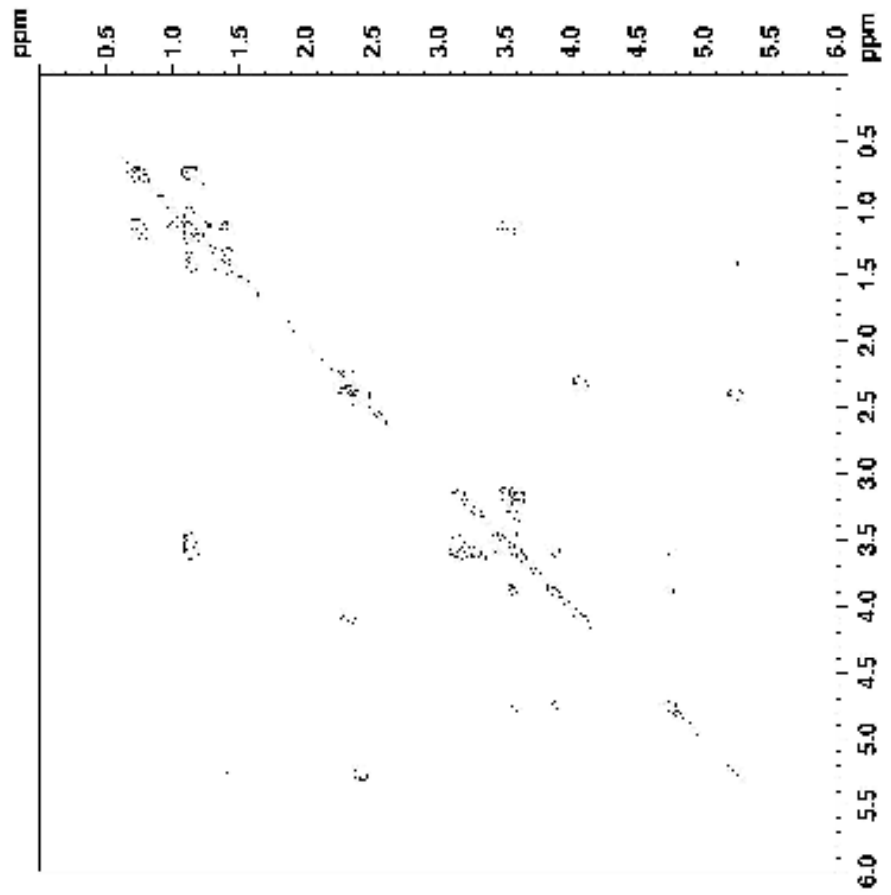
Espectros de RMN de <sup>13</sup>C da fração F<sub>2</sub>



Espectro 2D de RMN TOCSY da fração F<sub>2</sub>

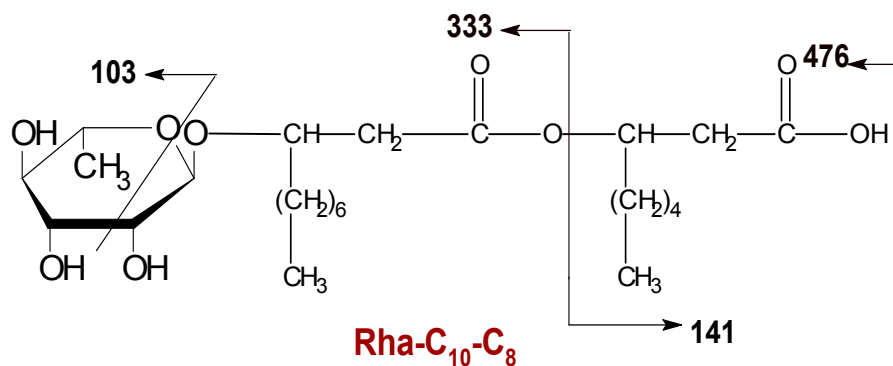
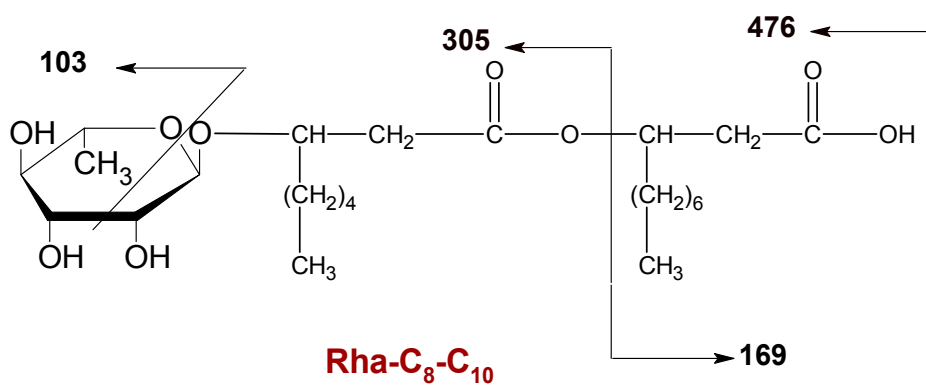


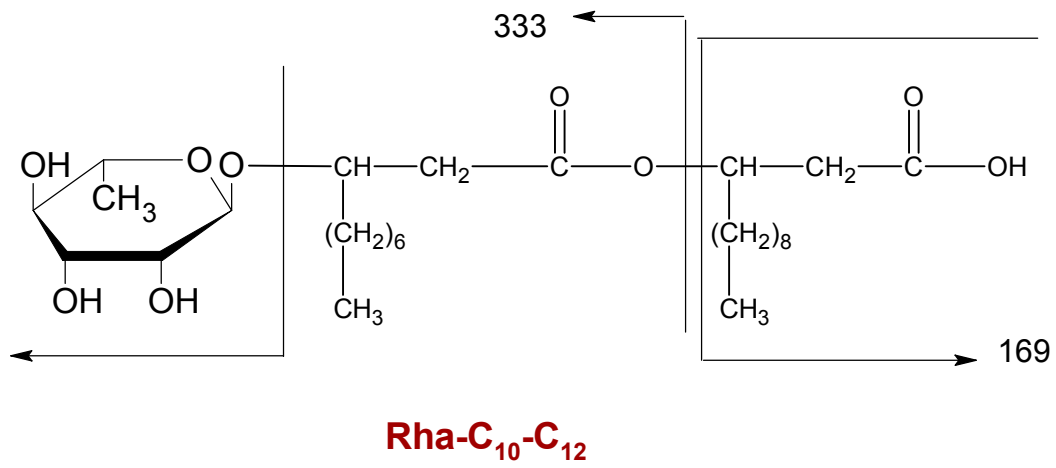
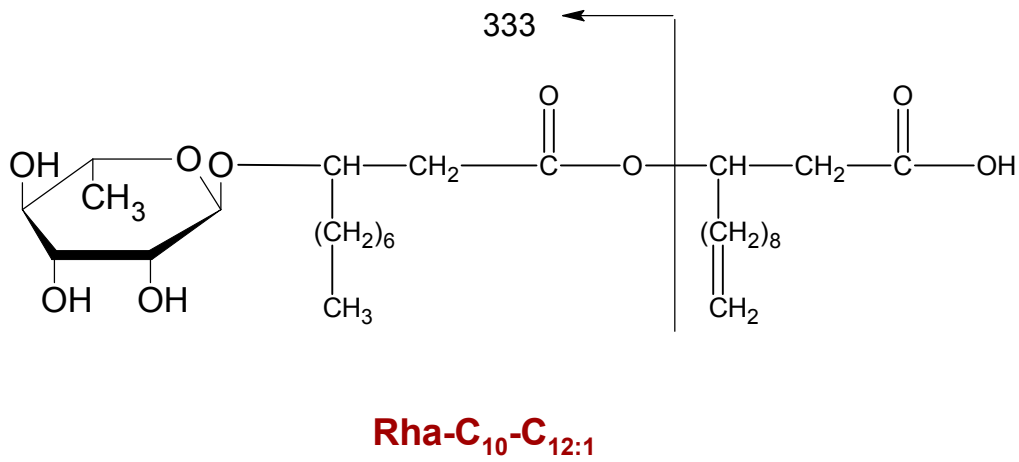
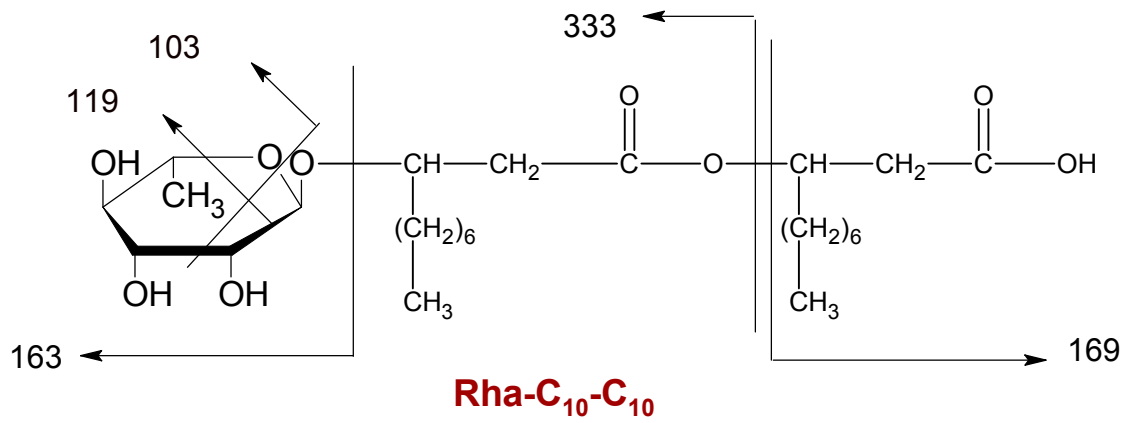
Espectro 2D de RMN COSY da fração F<sub>2</sub>

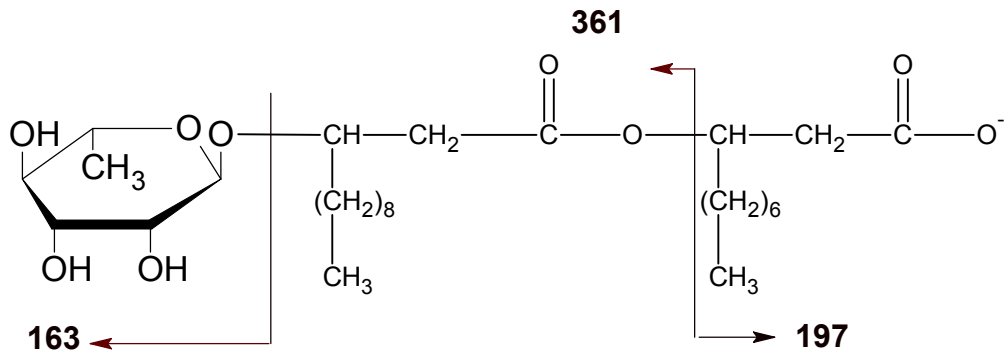


## ANEXO 2

Estruturas determinadas por ESI-MS para misturas dos homólogos produzidos por *P. aeruginosa* UFPEDA 614





**Rha-C<sub>12</sub>-C<sub>10</sub>**